

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELLA MARCON

**SOROTIPOS, CLONES E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE
Streptococcus pneumoniae ISOLADOS EM AMOSTRAS DE LÍQUOR NO
ESTADO DO PARANÁ**

CURITIBA

2010

ISABELLA MARCON

**SOROTIPOS, CLONES E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE
Streptococcus pneumoniae ISOLADOS EM AMOSTRAS DE LÍQUOR NO
ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre, no Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, Patologia e
Parasitologia Clínica do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Leise Bastos
Monteiro.

Co-orientador: Prof^a Msc Rosângela Stadnick. L.
de Almeida Torres

CURITIBA

2010

Marcon, Isabella

Sorotipos, Clones e Susceptibilidade a antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados em amostras de líquido no Estado do Paraná

Isabella Marcon. Curitiba, 2010.

106f

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

1. Sorotipos. 2. Clones. 3. *Streptococcus pneumoniae*. 4. Meningite bacteriana.

Ao meu noivo, Hilston, pelo amor, dedicação, força e paciência presente em todos os momentos.

Aos meus pais, Édio e Nelci, pelo apoio e incentivo ao aprimoramento profissional.

A meu irmão, Nickolas, pelo exemplo de superação.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. Cristina Leise Bastos Monteiro, orientadora desta dissertação, a qual abriu as portas para o desenvolvimento deste estudo. Agradeço de coração por ter acreditado no meu potencial e ter proporcionado momentos de muita perseverança. Meus carinhosos agradecimentos.
- À Prof^a. Msc. Rosângela S. L. de Almeida Torres, pesquisadora dedicada e co-orientadora deste estudo, pelo acolhimento e possibilidade de concretização desta dissertação, subsidiando meios para o suporte experimental e apoio técnico. Minha eterna consideração e admiração.
- À Dr^a. Denize B. Berto e Marilene Gelain, do Setor de Meningite, Seção de Bacteriologia, pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram.
- À Prof^a. Maria Luiza. L. S. Guerra, do Setor de Bactérias Piogênicas e Toxigênicas, Seção de Bacteriorologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, pela ajuda na sorotipagem das amostras em estudo.
- Ao Hilston Guerim, meu noivo e colega de profissão, pela presença e ajuda constante, proporcionando muita tranquilidade em todo o percurso deste estudo, mesmo nas horas de maior dificuldade e descrença. Meu eterno reconhecimento e amor.
- À querida Laura Cogo, pela prontidão na correção do trabalho e apoio com palavras amigas. Muito obrigada!
- À Valéria Vidal, Setor de Febre Reumática, Seção da Bacteriologia do Laboratório Central do Estado, pelas palavras otimistas, aconselhamento e disponibilidade. Meu sincero e carinhoso agradecimento.
- À Prof^a Dr^a Leda Satie Chubatsu e o técnico Walter, laboratório de Biologia Molecular, Ciências Biológicas, UFPR, pela assistência técnica e disponibilidade de equipamentos. Sem essa ajuda, certamente o estudo não poderia ter sido finalizado. Muito obrigada!

“É preciso demorar um tempo preparando o solo se quiser que ele acolha a semente.”

Ivone Carvalho

RESUMO

As infecções causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* continuam sendo uma das principais causas de morbimortalidade e motivo de preocupação mundial devido à resistência crescente a uma ou mais drogas. No Brasil, as taxas de resistência, de acordo com fatores variáveis, são de 24%. No Paraná, o perfil de resistência, os clones e os sorotipos mais frequentes são pouco relatados. O objetivo geral deste estudo foi determinar os sorotipos, clones e susceptibilidade a antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados em líquido (LCR) de pacientes com meningite bacteriana aguda (MBA), no Estado do Paraná. Foram analisadas 3.716 amostras de LCR de pacientes com suspeita de meningite, recebidas pelo Laboratório Central do Estado (LACEN), no período de maio de 2007 a outubro de 2009. Dentre essas amostras analisou-se 98 cepas de *S. pneumoniae*. Após isolamento e identificação da cepa, foi avaliada a sensibilidade à oxacilina pelo método de difusão de disco. Para penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina, meropenem e vancomicina, utilizou-se o método de E-test (*Epsilonometer-test*). As cepas isoladas foram sorotipadas pela técnica de Quellung, a qual é realizada no Instituto Adolf Lutz (IAL) em São Paulo. A positividade de micro-organismos isolados no universo de amostras foi de 474 casos (12,7%) e o *S. pneumoniae* foi o agente mais prevalente no estudo, correspondendo a 184 casos (38,8%). No total, 27 sorotipos foram encontrados, sendo os mais frequentes os sorotipos 14 (14,3%), 6B (11,2%) e 19F (9,2%). Das 98 cepas de pneumococo avaliadas no estudo, 36 (36,7%) apresentaram resistência à penicilina e 11 (11,2%) aos macrolídeos. O teste de PCR confirmou presença do gene *erm B* e gene *mef A*. Todas as cepas foram sensíveis à ciprofloxacina, meropenem e vancomicina. Na avaliação clonal dos isolados resistentes aos macrolídeos e do sorotipo 14, o mais prevalente, houve a identificação de clones e disseminação regional. A utilização de ferramentas moleculares, em conjunto com o isolamento, identificação, sorotipagem e descrição de resistência, permite um estudo epidemiológico das meningites que ocorrem no Estado do Paraná, auxiliando nas medidas de retenção, prevenção e tratamento eficaz das infecções causadas por *S. pneumoniae*.

Palavras Chave: *Streptococcus pneumoniae*. Meningite. Sorotipos. Clones. Resistência.

ABSTRACT

The infections caused by *Streptococcus pneumoniae* continue to be one of the major causes of morbidity and mortality. *S. pneumoniae* resistant to one or more drugs has spread worldwide. In Brazil, the resistance rates range, in accordance with changeable factors, around 24%. In the state of Paraná, the profile of resistance, clones and the serotypes most frequent of this pneumococcus are not well known. The objective of this study was to determine the serotypes, clones and susceptibility of the antimicrobial of isolated *S. pneumoniae* in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with acute bacterial meningitis (MBA), in the State of the Paraná. Three thousand seven hundred sixteen samples of CSF of patients with meningitis suspected were analyzed, received at the Central State Laboratory (LACEN), from the May 2007 to October 2009. Ninety eight positive culture for *S. pneumoniae* were analyzed. After strain isolation, sensitivity to oxacilin was determined by diffusion disk, and sensitivity to penicillin, ceftriaxone, ciprofloxacin, meropenem and vancomycin, was determined by the E-test (*Epsilon*-test). The strains isolated were sent to the Adolf Lutz Institute, in São Paulo, for serotyping by Quellung technique. The positivity rates of isolated micro-organisms in the universe of samples reached 474 cases (12.7%) and *S. pneumoniae* was the agent most prevalent in the study, corresponding to 184 samples (38.8%). In all, 27 serotypes had been found and the most frequent serotypes were 14 (14.3%), 6B (11.2%) and 19F (9.2%). Of the 98 strains of pneumococcus evaluated in this study, 36 (36.7%) resistant to penicillin were detected and 11 (11.2%) to macrolides, The PCR test confirmed presence of the *erm* B and *mef* A. All strains were sensitive to ciprofloxacin, meropenem and vancomycin. In the clonal evaluation of isolated resistant to macrolides and the most prevalent serotype of this study, were identified clones and regional dissemination. The use of molecular tools, in set with the isolation, serotype and description of resistance, allows to study the epidemiology in the state of Paraná, assisting in the measures of retention, prevention and efficient treatment of the infections caused by *S. pneumoniae*.

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*. Meningitidis. Serotypes. Clones. Resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 HISTÓRICO.....	17
3.2 CARACTERÍSTICAS DO MICRO-ORGANISMO.....	18
3.3 SOROTIPOS.....	19
3.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
3.5 EPIDEMIOLOGIA.....	21
3.5.1 Meningites.....	22
3.5.1.1 Meningite pneumocócica.....	23
3.6 PROFILAXIA DAS INFECÇÕES POR <i>Streptococcus pneumoniae</i>	24
3.6.1 Programa de vigilância.....	24
3.6.2 Vacina pneumocócica.....	25
3.7 ANTIMICROBIANOS.....	27
3.8 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	29
3.9 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
3.10 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	32
3.10.1 Identificação Laboratorial.....	32
3.10.2 Análise da Diversidade Genética.....	33
3.10.3 Identificação de Resistência.....	35
3.10.4 Identificação de Genes de Resistência.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	37
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
4.3 ANTIMICROBIANOS.....	38
4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR DISCO-DIFUSÃO.....	38
4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR DISCO-APROXIMAÇÃO (D- test).....	39
4.6 DETERMINAÇÃO DA CIM PELA TÉCNICA DE E-TEST (<i>Epsilometer</i>	

Test).....	39
4.7 REAÇÃO DE NEUFELD-QUELLUNG.....	40
4.8 TÉCNICA DE PFGE (<i>Pulsed Field Gel Eletrophoresis</i>).....	40
4.9 TÉCNICA DE PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	42
4.9.1 TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	42
4.9.1.1 Extração enzimática.....	42
4.9.1.2 Extração quente/frio.....	43
4.9.1.3 Extração quente/frio dupla.....	43
4.10 CONTROLE DE QUALIDADE.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 UNIVERSO DAS AMOSTRAS.....	44
5.1.1 Positividade das Amostras.....	44
5.2 ASPECTOS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	46
5.2.1 Características Demográficas.....	46
5.2.2 Distribuição Sazonal.....	47
5.2.3 Distribuição por Sexo e Faixa Etária.....	47
5.3 SOROTIPOS ENCONTRADOS.....	48
5.4 ANÁLISE DE RESISTÊNCIA.....	49
5.4.1 Análise Epidemiológica de Resistência.....	49
5.4.2 Testes de Susceptibilidade.....	51
5.4.2.1 Disco difusão.....	51
5.4.2.2 Disco aproximação (D-test).....	51
5.4.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM).....	52
5.4.3 Pesquisa de Genes de Resistência.....	53
5.4.3.1 Extração de DNA.....	53
5.4.3.2 PCR.....	54
5.4.4 Pesquisa de Clones.....	56
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO 1 - IDENTIFICAÇÃO, DADOS DEMOGRÁFICOS E SOROTIPOS	91
ANEXO 2 - TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE.....	95
ANEXO 3 - ESPECIFICAÇÕES DO PFGE.....	99

ANEXO 4 - ESPECIFICAÇÕES DO PCR.....	101
ANEXO 5 - REGIONAIS DE SAÚDE NO ESTADO DO PARANÁ.....	103
ANEXO 6 – VACINAS PNEUMOCÓCICAS CONJUGADAS.....	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	CARACTERÍSTICAS DE α HEMÓLISE E GRAM POSITIVO DE <i>S.pneumoniae</i>	19
FIGURA 2 -	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OPTOQUINA.....	32
FIGURA 3 -	CUBA ELETROFORÉTICA COM ELETRODOS EM POSIÇÃO HEXAGONAL.....	35
FIGURA 4 -	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ E A INCIDÊNCIA DE RESISTÊNCIA À PENICILINA.....	49
FIGURA 5 -	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ E A INCIDÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS.....	50
FIGURA 6 -	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE D-TEST.....	51
FIGURA 7 -	CIM DOS ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE E-TEST.....	52
FIGURA 8 -	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	54
FIGURA 9 -	PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA <i>erm B</i>	55
FIGURA 10 -	PESQUISA DE GENE DE RESISTÊNCIA <i>mef A</i>	56
FIGURA 11 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DE MACRORESTRIÇÃO DAS CEPAS RESISTENTES AOS MACROLÍDEOS.....	57
FIGURA 12 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DE MACRORESTRIÇÃO DOS ISOLADOS DO SOROTIPO 14.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DOS ISOLADOS.....	46
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DOS ISOLADOS DE <i>S. pneumoniae</i>	47
GRÁFICO 3 - INCIDÊNCIA DOS SOROTIPOS.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MICRO-ORGANISMOS ENCONTRADOS.....	45
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE <i>S. pneumoniae</i> POR FAIXA ETÁRIA.....	48
TABELA 3 - RESISTÊNCIA À OXACILINA X SOROTIPO.....	50
TABELA 4 - RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS X SOROTIPO.....	51
TABELA 5 - RESISTÊNCIA AOS DEMAIS ANTIMICROBIANOS.....	52
TABELA 6 - CIM 50 E CIM 90 DOS ANTIMICROBIANOS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	-	Concentração inibitória mínima
CLSI	-	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CSF	-	<i>Cerebrospinal fluid</i>
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
D-Teste	-	Teste de disco aproximação
<i>erm A</i>	-	<i>Erythromycin resistance methylase A</i>
<i>erm B</i>	-	<i>Erythromycin resistance methylase B</i>
Eteste®	-	<i>Epsilometer-Test</i>
EUA	-	Estados Unidos da América
GSK	-	Glaxo Smith Kline
LACEN	-	Laboratório Central do Estado
LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
<i>mef</i>	-	<i>Macrolide efflux pumps</i>
MLS _B	-	<i>Macrolide-lincosamide-streptogramin B</i>
PBP	-	Proteína ligadora de penicilina
PC	-	Polissacarídeo capsular
PCR	-	Reação de cadeia em polimerase
PFGE	-	<i>Pulsed Field Gel Eletrophoresis</i>
RAPD	-	<i>Random amplifield polymorphic DNA</i>
rpm	-	Rotações por minuto
SIREVA	-	Sistema Regional de Vacinas
SUS	-	Sistema Único de Saúde

1 INTRODUÇÃO

Há mais de um século, as infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae* são motivo de grande preocupação, pela sua incidência, mortalidade, letalidade e aumento da resistência aos antimicrobianos (SIMONSEN *et al.*, 2004; ROSSONI *et al.*, 2008). Em casos de infecção em líquido cefalorraquidiano (LCR), trata-se do segundo micro-organismo de maior incidência (FIOCRUZ, 2010). É também um dos agentes etiológicos bacterianos que mais causam otites médias, sinusites e pneumonias no Brasil (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

A colonização por *S. pneumoniae*, também chamado de pneumococo, é variável conforme população estudada, estação do ano, existência de irmãos menores de cinco anos e convivência em creches e escolas (MUSHER, 1992). Já as infecções ocorrem em todas as faixas etárias, sendo mais frequentes na infância e nas idades mais avançadas, em fumantes e em pessoas com uma doença de base ou imunodeficiência (IAL, 2010; ANVISA, 2010).

Os esforços para diminuir a mortalidade das infecções pneumocócicas estão baseados, principalmente, num diagnóstico rápido e na terapia antimicrobiana adequada (FIOCRUZ, 2010).

O diagnóstico e a identificação laboratorial do pneumococo podem ser realizados através do cultivo bacteriano, métodos imunológicos ou moleculares (KELLOGG *et al.*, 2001). Entre os métodos imunológicos, a sorotipagem, através da reação de Neufeld-Quellung possibilita a diferenciação laboratorial entre sorotipos do pneumococo e, baseados na diversidade antigênica da cápsula polissacarídea, mais de 90 sorotipos de *S. pneumoniae* já foram descritos (IAL, 2010; CDC, 2010). Fatores como sítio anatômico afetado, área geográfica e idade do paciente influenciam na incidência e distribuição dos sorotipos (DI FABIO, 2001). O conhecimento da sorotipagem é de extrema importância, já que, o perfil de virulência do pneumococo e o desenvolvimento de novas vacinas dependem do estudo da composição química do polissacarídeo capsular produzido pela cepa (REN *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de métodos moleculares, como a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), possibilita um diagnóstico rápido de isolados

resistentes, através da identificação de genes de resistência (SCHUURMAN *et al.*, 2004; PARENT *et al.*, 2005; WELINDER-OLSSON *et al.*, 2007).

A Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE*) é atualmente a ferramenta molecular mais apropriada para a elucidação de surtos ou epidemias; permite acompanhar a disseminação clonal de cepas virulentas em um hospital ou comunidade com o seu alto poder discriminatório entre os isolados (YAN *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003; KASAHARA *et al.*, 2005).

De modo profilático, há o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas conjugadas (23-valente e 7-valente), garantindo a proteção contra infecções causadas por uma variedade de pneumococos, além de diminuição da disseminação das infecções pneumocócicas resistentes aos antimicrobianos (CDC, 2010).

Os poucos relatos, envolvendo meningites pneumocócicas no Estado do Paraná, confirmam a necessidade de maiores estudos epidemiológicos na população paranaense. A ausência de dados atuais sobre os sorotipos circulantes dificulta a profilaxia com as vacinas pneumocócicas disponíveis (BRANDILEONE, 2007; ROSSONI *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os sorotipos, clones e susceptibilidade a antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados em líquido de pacientes com meningite bacteriana aguda (MBA), no Estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os principais agentes causadores de meningite no Estado do Paraná no período analisado.
- Descrever os sorotipos encontrados.
- Estimar a susceptibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae*.
- Pesquisar o fenótipo e genótipo de casos de resistência aos macrolídeos.
- Analisar aspectos gerais da população estudada e a dispersão dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* resistentes aos macrolídeos e à penicilina no Estado do Paraná.
- Correlacionar os perfis eletroforéticos de macrorestrição dos isolados resistentes aos macrolídeos e sorotipo mais freqüente pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), utilizando os critérios de TENOVER.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

S. pneumoniae foi primeiramente isolado em amostras de tecidos pulmonares, em 1875 por Klebs. Em seguida, o feito foi de Ebert, 1880 e Koch, 1881. Relatos no mesmo período foram em relação ao isolamento do pneumococo em faringe de indivíduos sãos, nos Estados Unidos da América (EUA) por Stenberg e França, por Pasteur (AUSTRIAN, 1981 a).

A correlação com doença aconteceu quando os mesmos pesquisadores inocularam a bactéria isolada em coelhos. Em 1882, a associação com pneumonia foi descrita por Friedlander, e em 1886, por Weichselbaum. E num período de 10 anos este micro-organismo já estava associado como agente causal de endocardites, meningites purulentas, otites, artrites, sinusites e conjuntivites (AUSTRIAN, 1981a).

A partir da década de 1980, as atenções da comunidade científica foram direcionadas a considerar o pneumococo um dos principais micro-organismos patogênicos para o homem (IAL, 2010), visto que, é comumente o agente causador de otite média aguda, bronquite crônica, sinusite aguda, pneumonia e também a maior causa de bacteremia (HOBERTMAN, 2002; ANON, 2004).

Em meados de 1990, dados mundiais indicavam que o principal agente etiológico das meningites bacterianas, em áreas endêmicas ou epidêmicas, era o *Neisseria meningitidis*, seguido por *Haemophilus influenzae* ou por *S. pneumoniae*. Nos países onde a vacina conjugada de *H. influenzae* tipo B é administrada rotineiramente em crianças, *S. pneumoniae* oscila, juntamente com *N. meningitidis*, entre a primeira e a segunda causa (ROSSONI, 2003; WEISFELT *et al.*, 2006).

O primeiro caso de pneumococo resistente à penicilina foi relatado em Nova Guinéa, na década de 1960 (CANDIANI, 2004). Dez anos depois, casos de resistência foram relatados na África e na Espanha (MANTESE, 1999). Nos últimos anos, relatos de infecções causadas pelo pneumococo têm aumentado

consideravelmente e a pesquisa por *S. pneumoniae* penicilina-resistente estende-se no mundo todo (MANTESE *et al.*, 2003).

Em questão de profilaxia, estudos para o desenvolvimento das vacinas pneumocócicas iniciaram-se por Klepers no ano de 1891, utilizando antissoro em coelhos para verificação de imunidade e soro específico contra o pneumococo. Durante pouco mais de três décadas os estudos não obtiveram sucesso, fato este justificado pelo desconhecimento na época da diversidade de polissacarídeos capsulares. Em 1925, Dochez e Avery, seguidos por Avery e Morgan, 1927, criam o conceito de antígeno polissacarídeo capsular. Posteriormente, em 1930, Francis e Tillet demonstraram a antigenicidade desses polissacarídeos frente ao homem (AUSTRIAN, 1981b, MUSER *et al.*, 1993).

3.2 CARACTERÍSTICAS DO MICRO-ORGANISMO

Streptococcus pneumoniae pertence ao gênero *Streptococcus*, da família Streptococcaceae, é uma bactéria que se apresenta pela coloração do Gram como coco, agregados aos pares, denominados diplococos, ou em cadeias curtas, Gram positivo (FIGURA 1b). São micro-organismos imóveis, não formadores de esporos, apresentando células esféricas, ovais ou lanceoladas, com 0,5 a 2,0 µm de diâmetro. Possui uma cápsula polissacarídica externa e uma parede celular sobre a membrana citoplasmática, que, em geral, suscitam reações imunes específicas. É uma bactéria anaeróbia facultativa, catalase negativa. Utiliza ampla variedade de carboidratos como fonte de energia, sendo sensível ao calor, ao frio e ao ressecamento (MANTESE *et al.*, 2003; ROSSONI *et al.*, 2008; IAL, 2010).

Em placas de ágar-sangue cresce como colônias lisas, pequenas, brilhantes, côncavas, circundadas por um halo esverdeado de alfa-hemólise (FIGURA 1a). É facilmente lisado por detergentes como a bile, desoxicolato de sódio ou pela optoquina, podendo perder sua característica de Gram positivo quando cultivado após a fase logarítmica, período mais ativo do crescimento

bacteriano. As colônias de *S. pneumoniae* podem exibir uma zona de depressão central causada por uma autólise parcial das células (IAL, 2010).

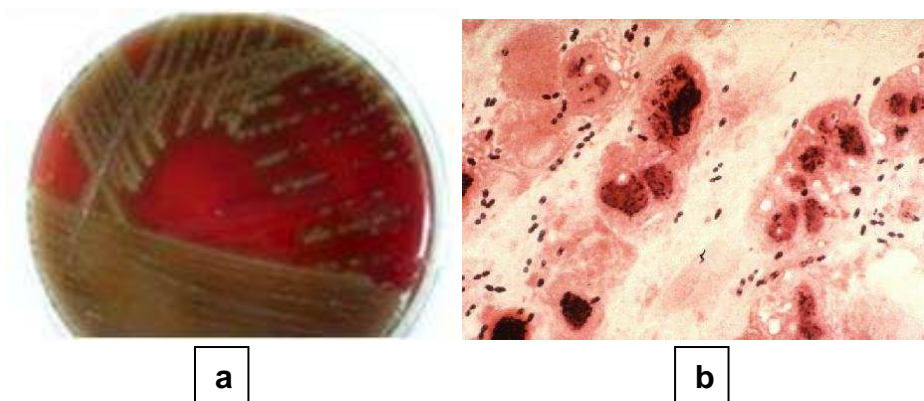


FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS DE α HEMÓLISE E GRAM POSITIVO DE *S.pneumoniae*

LEGENDA - a) α hemólise no crescimento do *S. pneumoniae* em ágar sangue tryptose. b) características do *S.pneumoniae* em Gram positivo, diplococo, com formato lanceolado.

FONTE – a autora (2010).

Em 1990 Neufeld descreveu a solubilidade em bile, característica essa que é utilizada até os dias atuais na análise microbiológica desse micro-organismo e em 1992, o mesmo autor descreveu a reação de Quellung, que é a técnica padrão para identificação dos sorotipos dos pneumococos.

3.3 SOROTIPOS

O polissacarídeo capsular (PS) é um determinante essencial da antigenicidade do pneumococo por interromper a atividade fagocitária através da neutralização do fagossomo, impedindo a degradação intracelular (IAL, 2010).

A reação de Neufeld-Quellung baseia-se na capacidade do soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria em suspensão. Além de proporcionar a identificação rápida e segura do pneumococo, permite a sua classificação e o reconhecimento dos sorotipos.

A diferenciação da espécie em sorotipos é baseada numa reação sorológica da cápsula polissacarídica de *S. pneumoniae*. Mais de 90 sorotipos já foram relatados (CDC, 2010; IAL, 2010). O conhecimento dos sorotipos que acometem cada área geográfica possibilita um maior entendimento da transmissibilidade do micro-organismo (DI FABIO, 2001). De acordo com Brandileone (1998), os sorotipos mais frequentes no Brasil normalmente são também os mais prevalente em outros países. Em 1999, a mesma autora relata os 12 sorotipos mais prevalentes no Brasil: 14, 1, 6B, 18C, 5, 3, 6A, 23F, 9V, 19F, 4 e 19A, identificados em 75,6% das cepas avaliadas.

Apesar do grande número de sorotipos conhecidos, apenas uma pequena parcela predomina como causa de doença no homem (IAL, 2010).

3.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae pode ser isolado de diferentes líquidos normalmente estéreis, como o LCR, sangue, líquidos pleural, ascítico e sinovial, e em secreções de abscessos (ANVISA, 2010). Trata-se do agente mais identificado em casos de pneumonia, e, desde o uso da vacina contra o *Haemophilus influenzae*, está se tornando o maior agente causador de meningites. Além disso, continua sendo assunto de consenso global pelo aumento de resistência aos antimicrobianos (ROSSONI *et al.*, 2008).

Cerca de 10% dos pacientes que apresentam doença invasiva causada pelo *S. pneumoniae* evoluem ao óbito (CDC, 2003; CDC, 2005). A taxa de letalidade em crianças menores de cinco anos varia entre 2% e 20%, sendo observadas seqüelas neurológicas em 12 a 15% dos casos (GENDELMAN, PERSIDSKY, 2005).

O tratamento precoce pela administração de antibióticos antes da admissão hospitalar leva à diminuição dos níveis de mortalidade e morbidade, porém, antecede e prejudica a investigação e diagnóstico laboratorial do agente etiológico (LEPUR, BARSIC, 2007). Assim, cada região ou país deve decidir qual

melhor esquema de tratamento que lhe é apropriado e avaliá-lo periodicamente (SCHUT *et al.*, 2008).

3.5 EPIDEMIOLOGIA

A colonização do pneumococo em mucosas do trato respiratório superior do homem pode existir sem causar quadros infecciosos. Cerca de 15% dos adultos saudáveis e 65% das crianças apresentam colonização (CDC, 2010). Apesar disso, o *S. pneumoniae* é capaz de causar de infecções respiratórias assintomáticas a doenças invasivas, como septicemias ou meningites (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; IAL, 2010).

A infecção por *S. pneumoniae* geralmente é secundária, decorrente de uma infecção primária por vírus ou distúrbios da microbiota local. No portador, mecanismos inespecíficos de defesa como tosse, coriza, reflexo epiglotal e movimento muco-ciliar previnem a penetração dos micro-organismos através do epitélio superficial do trato respiratório superior. O sistema fagocitário é a segunda linha de defesa, porém, pela presença da cápsula polissacarídea, o *S. pneumoniae* pode “escapar” da opsonização pelas imunoglobulinas (IAL, 2010).

S. pneumoniae infecta exclusivamente o ser humano e necessita de contato direto entre transmissor e receptor do micro-organismo, já que o modo de sua transmissão ocorre por aerossóis de doentes ou portadores nasais saudáveis (CDC, 2010; IAL, 2010). O pneumococo ocorre em todas as faixas etárias, sendo mais frequente nos dois extremos da vida, como também em pessoas com uma doença de base ou imunodeficiência (GENDELMAN, PERSIDSKY, 2005).

O hospedeiro saudável geralmente é resistente à doença por *S. pneumoniae* (IAL, 2010). Porém, a convivência em escolas ou creches e a existência de irmãos menores de cinco anos é um fator predisponente ao indivíduo. Os fatores de risco devem ser associados a um desenvolvimento de infecção pneumocócica como idade, estação do ano, ambientes com conglomerados de pessoas, infecções respiratórias prévias de trato respiratório, etilismo e tabagismo (ROSSONI *et al.*, 2008). Além desses, fatores que diminuem

a imunidade do indivíduo são desencadeadores de infecções pneumocócicas, como HIV positivo, diabetes, tabagismo e asplenia (CDC, 2010).

Um levantamento realizado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), no período de 2000 a 2006, afirma que 57% do material clínico para identificação laboratorial das infecções é LCR. No diagnóstico clínico, 62% são casos de meningite, seguido de 28% casos de pneumoniae e apenas 2% de bacteremia (BRANDILEONE *et al.*, 2007).

Estima-se que ocorram mais de um milhão de casos e 200 mil óbitos relacionados às MBA por ano (BEPA, 2010). Nos EUA, a incidência anual do pneumococo em casos de bacteremia é de 8.000 (VPD, 2008). No Brasil, a incidência anual de bacteremia por pneumococo é estimada em 150/100.000 habitantes em crianças abaixo de dois anos de idade (NAZIANZENO, NÓBREGA, JUNIOR, 2007).

Em 2008, o número de internações no SUS (Sistema Único de Saúde) por doença pneumocócica caiu 26,8%. O decréscimo é justificado pela utilização da vacina pneumocócica (FIOCRUZ, 2010).

3.5.1 Meningites

O termo meningite expressa a ocorrência de um processo inflamatório das meninges, membranas que envolvem o cérebro. Da colonização do pneumococo à invasão da mucosa, acesso à corrente sanguínea e chegada ao LCR (CDC, 1998), o tempo de incubação é de dois a dez dias, com exceção da meningite tuberculosa, que manifesta a infecção nos primeiros seis meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Os principais sintomas são causados pelo aumento da pressão intracraniana, como cefaléia, febre alta, vômitos, fotofobia, convulsões e rigidez na nuca, ombro ou costas (CDC, 2010).

A meningite é uma doença severa e endêmica que pode acometer indivíduos de qualquer idade. É causada por diversos agentes infecciosos como bactérias, vírus, parasitas e fungos. As MBA são, do ponto de vista clínico, as

mais graves para a saúde pública, pela magnitude de sua ocorrência e potencial de produzir surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Apesar de a anamnese clínica apresentar fatores que predisõem ao diagnóstico de meningite, técnicas de identificação laboratorial devem ser realizadas para o conhecimento do agente causador da infecção (MENAKER *et al.*, 2005). Mesmo após o advento dos antibióticos, há mais de 50 anos, a meningite do tipo bacteriana apresenta altos níveis de mortalidade e graves sequelas e necessitando de um rápido diagnóstico clínico ou laboratorial (REYES *et al.*, 2008; IAL, 2010).

Na Bahia, o perfil etiológico das MBA foi de acordo com os dados da literatura em outras partes do mundo, permanecendo *H. influenzae* tipo B o agente mais freqüente, seguido por *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* (REYES *et al.*, 2008). Estudos afirmam que *S. pneumoniae* é o segundo micro-organismo de maior incidência em meningites bacterianas (ROSSONI, 2008; FIOCRUZ, 2010). No Estado do Paraná (2000), o principal agente etiológico das meningites bacterianas agudas foi *N. meningitidis* seguida por *S. pneumoniae*. (PARANÁ, 2000). Rossoni (2003) ratificou esses dados.

3.5.1.1 Meningite pneumocócica

A meningite causada por *S. pneumoniae* tem se tornado uma das principais causas de meningite bacteriana nas últimas duas décadas (RAJKHAN *et al.*, 2010). Nos EUA, 2.000 casos de meningites pneumocócicas por ano são relatados (VPD, 2008). Entre os anos de 2000 a 2008, a média anual nacional de meningite pneumocócica foi de 1.250 casos e de 370 óbitos (FIOCRUZ, 2010).

A meningite pneumocócica é a complicação mais comum decorrente de sinusite, mastoidite, otite ou pneumonia e caracteriza-se por ser recorrente (IAL, 2010; FIOCRUZ, 2010). Entretanto, o maior problema dessa infecção é a sua alta letalidade, especialmente em países da África (NAZIANZENO, NÓBREGA, JUNIOR, 2007). Os índices de morbidade e mortalidade em crianças podem atingir percentuais de 30% ou mais e cerca de 5% das crianças que apresentam meningite pneumocócica com idade inferior aos cinco anos, apresentarão perda

da audição ou evoluirão a óbito (HUSAI *et al.*, 2006; KONIOR *et al.*, 2009; HARBOE *et al.*, 2010; CDC, 2010).

3.6 PROFILAXIA DAS INFECÇÕES POR *Streptococcus pneumoniae*

A solução para o grave problema da meningite e demais infecções pneumocócicas possivelmente está no uso de agentes imunizantes que sejam efetivos mesmo em lactentes (NAZIANZENO, NÓBREGA, JUNIOR, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

3.6.1 Programa de Vigilância

O Sistema Regional de Vacinas (SIREVA), implantado no Brasil em 1993, caracteriza-se como um sistema de vigilância epidemiológica para o monitoramento de infecções bacterianas invasivas causadas por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis* em crianças menores de seis anos. No âmbito nacional, participam da rede os Laboratórios Centrais (LACEN), Hospitais Universitários e Privados. A rede estende-se a outros países da América Latina (BRANDILEONE, 2007).

Os principais objetivos da rede SIREVA são: determinar os sorotipos prevalentes, avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana, identificar clones virulentos e de resistência, além de implantar um controle de qualidade e caracterização desses isolados nos laboratórios da rede. A rede também proporciona a capacitação do país para a caracterização fenotípica e molecular de *S. pneumoniae* e de *H. influenzae* (BRANDILEONE, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Desde a sua implantação no Brasil, o SIREVA aumentou o acompanhamento de 1.622 cepas de *S. pneumoniae* (1977-1992), na maioria do Estado de São Paulo, para 8.267 (1993- 2006). Estados como Paraná, Bahia,

Pernambuco e Minas Gerais destacam-se na notificação dos casos neste período (BRANDILEONE, 2007).

3.6.2 Vacina Pneumocócica

Para que possam conferir proteção abrangente à população de risco, as vacinas pneumocócicas são compostas por vários sorotipos, selecionados entre os que mais causam doença (BEPA, 2010).

Na década de 1980 houve o início do desenvolvimento de vacinas pneumocócicas (IAL, 2010). A pioneira foi a vacina tetravalente, seguida da hexavalente. Com a implantação da antibioticoterapia, essas entraram em desuso. Porém, com as altas taxas de mortalidade, voltou-se a necessidade e o interesse pela profilaxia das infecções causadas pelo pneumococo. Assim, em 1977, a vacina polissacarídica 14-valente foi licenciada (ROBBINS, *et al.*, 1983; CDC, 1997). Atualmente, dois tipos de vacinas polivalentes estão licenciadas, uma disponível no mercado internacional desde 1985, composta por 23 polissacarídeos capsulares livres, e outra composta por 7 polissacarídeos capsulares (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) conjugados à uma proteína, licenciada no Brasil em 2000 (BEPA, 2010; FIOCRUZ, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A vacina 23-valente não produz resposta imunológica timo-dependente. Consequentemente, não produz célula de memória eficaz e duradoura. Por ser polissacarídica, é indicada somente para crianças a partir de dois anos de idade (SPIKA, FEDSON, FACKLAM, 1990). A sua constituição é baseada nos sorotipos mais frequentemente isolados (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33), os quais são responsáveis cerca de 90% das infecções invasivas nos EUA e em alguns países, incluindo o Brasil (ROBBINS *et al.*, 1983; MONTANER *et al.*, 2001; PAHO, 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), o sucesso obtido com a vacina conjugada contra o *H. influenzae* do tipo B, tem estimulado o uso de vacinas contra o *S. pneumoniae*. Estudos contínuos tornaram possível a

licenciatura, em 2000, da vacina 7-valente, a qual é utilizada até hoje. A vacina apresenta uma proteína carreadora conjugada ao polissacarídeo, induzindo uma resposta protetora, mais duradoura e dependente das células T. E, por ser pouco reatogênica, pode ser administrada em crianças a partir de dois meses (BLACK *et al.*, 2000; OBARO, 2002).

Pesquisadores do CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*) afirmam que a vacina 7-valente apresenta 96% de efetividade contra infecções pneumocócicas em crianças saudáveis. Corcoles e colaboradores, em 2010, confirmam a efetividade em pacientes de alto risco e idosos. Na Califórnia, a efetividade é de 90% na prevenção de doenças invasivas em crianças e redução no número de episódios de pneumonia (CDC, 2010). No Brasil, entre 2000-2006, o impacto estimado das vacinas conjugadas em crianças menores de seis anos, foi de 89% para a vacina 13-valente, 79% para a 10-valente, 77% para a 9-valente e 68% para a 7-valente (BRANDILEONE, 2007).

Desde o ano de 2008, Canadá, Austrália e países europeus (totalizando 18), utilizam rotineiramente a vacina conjugada pneumocócica (CDC, 2010). Antes da implantação da vacina pneumocócica, nos EUA, o número de casos por ano de pneumonia pneumocócica chegava a 175.000 (VPD, 2008). Na Polônia, os casos mais sérios de infecções invasivas correspondiam a pneumococos de sorotipos presentes na vacina 7-valente (KONIOR *et al.*, 2009).

A estipulação de critérios para a aplicação da vacina pneumocócica reduz o número de pacientes contemplados pela proteção (ANEXO 6). A vacina pneumocócica é recomendada para todas as crianças que tenham menos de 5 anos de idade e adultos acima de 65 anos. Também é recomendada aos adultos entre 19 e 64 anos com doença pulmonar crônica, diabetes, câncer, fumantes, asmáticos, imunossuprimidos, portadores de mieloma múltiplo, falência renal, infecção pelo HIV, transplantados ou em tratamento de radioterapia. (FIOCRUZ, 2010; CDC, 2010).

Um acordo firmado em 2009 entre o Ministério da Saúde e o laboratório *Glaxo Smith Kline* (GSK) possibilitará para o ano de 2010, a produção da vacina 10-valente pela Fundação Oswaldo Cruz. A vacina foi incluída no calendário básico de vacinação da rede pública de saúde, em abril, para a prevenção de infecções pneumocócicas como pneumonia, bacteremia e meningite (FIOCRUZ,

2010). Nos EUA, a nova vacina conjugada pneumocócica 13-valente será introduzida no presente ano, objetivando diminuir ou reverter a disseminação das infecções pneumocócicas resistentes aos antimicrobianos (CDC, 2010).

3.7 ANTIMICROBIANOS

A penicilina é considerada um antibiótico β -lactâmico de referência no tratamento de doença pneumocócica, utilizada na prática clínica desde 1940 e continua sendo a droga de escolha, quando o *S. pneumoniae* demonstra-se susceptível. Esta susceptibilidade depende do antimicrobiano penetrar no envoltório bacteriano e de se ligar covalentemente em sua forma ativa a pontos alvos da parede celular, levando a lise e a morte bacteriana. Portanto, a penicilina, assim como os outros antibióticos β -lactâmicos, tem atividade bactericida (MANTESE *et al.*, 2003).

O grupo de β -lactâmicos tem como sítio de ação às proteínas ligadoras de penicilina (PBP), existentes na parede celular bacteriana. Seis PBP imunologicamente diferentes foram descritas, sendo cinco de alto peso molecular (1A, 1B, 2A, 2B e 2X), e uma de baixo peso molecular (TOMAZ, 2000). As PBP catalizam a síntese de peptidoglicano, o qual protege contra choques osmóticos e lise celular. (KERNODLE, 2000).

O tratamento de pneumonia adquirida em adultos, causada por *S. pneumoniae*, pode ser realizado com antimicrobianos β -lactâmicos e macrolídeos (NIEDERMAN *et al.*, 2001; MANDELL *et al.*, 2003). A alta incidência de infecções pneumocócicas resistentes a essas drogas está sendo relatada, com predominância em países asiáticos (MOROZUMI *et al.*, 2006). Antimicrobianos classificados como macrolídeos (p.ex. eritromicina) e lincosamidas (p.ex. clindamicina) demonstram uma forte atividade contra os estreptococos e comumente e podem ser utilizados no tratamento de infecções comunitárias causadas por *S. pneumoniae*. Também são de escolha na terapia alternativa nos casos de pacientes intolerantes aos β -lactâmicos (EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2010).

No tratamento de otite média aguda (OMA) o que parece ser mais adequado para o Brasil, é a terapêutica inicial com amoxicilina. Outra opção é a substituição pela cefalosporina (ROSSONI, 2003). Quando há falha terapêutica, as drogas de segunda linha são: cefuroxima, ceftriaxona, clindamicina, clorafenicol ou meropenem. Infecções por estafilococos ou enterococos resistentes, esta deve ter seu uso o mais restrito possível (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1997).

No caso de meningites de provável etiologia pneumocócica deve-se mudar a conduta antiga da utilização de penicilina até o resultado do antibiograma, pois o nível líquido de 1,0µg/ml promovido pela posologia habitual não é suficiente mesmo para as cepas de resistência intermediária (KAPLAN, MASON, 1998). De acordo com a equipe de neuropediatria do Hospital Pequeno Príncipe (Curitiba, PR), referência no atendimento de saúde infantil, o tratamento empírico inicial, em recém nascidos com suspeita de MBA, deve ser a associação de ampicilina e cefotaxima. Na faixa etária de 4 semanas a 3 meses, a terapia sugerida é a associação da ampicilina com uma cefalosporina de terceira geração. Dos 3 meses aos 50 anos de idade, recomenda-se o uso de uma cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona ou cefotaxima) e, como alternativa, a associação de ampicilina ao cloranfenicol. Para gestantes, imunossuprimidos e pacientes acima de 50 anos, a terapia deve ser uma associação de uma cefalosporina de terceira geração a ampicilina (UNIPP, 2010).

A terapêutica empírica inicial no tratamento da meningite pneumocócica deve ser obrigatoriamente cefalosporina de terceira geração. Após antibiograma, se sensível, utilizar penicilina, do contrário, continuar com a cefalosporina de terceira geração (UNIPP, 2010).

A identificação etiológica do agente causador da meningite e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos são necessários para então, decidir-se entre manter ou não a terapia empírica (ROSSONI, 2003; CANDIANI, 2004; UNIPP, 2010).

3.8 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

O principal mecanismo de resistência do pneumococo é de natureza cromossômica, de aquisição por mutação/ transformação e apresenta como mecanismo, a alteração das PBP, enzimas envolvidas na síntese da parede bacteriana (BRANDILEONE, 2007). A diminuição da afinidade das PBP à penicilina pode envolver alteração em uma única PBP ou em diferentes PBP ao mesmo tempo, levando a uma resistência aditiva ou progressiva (IAL, 2010). A proliferação do gene de codificação em mosaico das PBP é a causa determinante ao surgimento da resistência do *S. pneumoniae* aos β -lactâmicos (HAKENBECK, 1980; BRANDILEONE, 2007). A grande variabilidade do grau de sensibilidade do pneumococo aos antimicrobianos foi confirmada pelo relato de oitenta e três mutações na região solúvel da molécula PBP, através do aparecimento das linhagens com sensibilidade intermediária (DESSEN *et al.*, 2001).

Já os pneumococos com resistência às cefalosporinas apresentam alterações somente nas PBP1A e 2X. Geralmente, a resistência é intermediária, podendo ocorrer resistência cruzada em até 27% dos pneumococos resistentes à penicilina e às cefalosporinas de terceira geração (CANDIANI, 2004).

Na maioria dos casos, dois mecanismos de resistência aos macrolídeos nos pneumococos são relatados: bomba de efluxo e modificação pós transcricional no RNA ribossômico, realizado por enzimas da classe metilase (FARREL, 2004). O gene *mef A* é o responsável pelo mecanismo de efluxo e foi o mais encontrado em isolados de *S. pneumoniae* na América do Norte enquanto que, na Europa, a prevalência é do mecanismo de metilação do RNA ribossômico, através do gene *erm B* (FARRELL, 2004; MONACO, 2005). Este mecanismo possibilita resistência a altas doses de eritromicina e co-resistência à lincosamina (JENKINS *et al.*, 2008).

A prevalência entre os isolados clonais da combinação dos genótipos *erm B* e *mef A*, com alto nível de resistência aos macrolídeos, está aumentando e a propagação dos mesmos gera uma séria implicação à saúde (JENKINS *et al.*, 2008). Isolados de *S. pneumoniae* com ambos os genes são tipicamente multirresistentes (FARREL, 2004).

O *erm* A subclasse *erm* TR é um gene comum de resistência aos macrolídeos em *Streptococcus pyogenes*, mas um tanto raro em *S. pneumoniae*. (BETRIU, 2000; SYROGIANNOPOULOS, 2001; DAVIES, 2005; DOBAY, 2005; VAN ELDERE, 2005).

3.9 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Streptococcus pneumoniae*

Estudos identificaram alguns fatores de risco associados ao desenvolvimento de infecção por pneumococo resistente à penicilina. A imunodeficiência tem sido relatada como importante fator, do mesmo modo que o uso prévio de antibiótico, em especial os β -lactâmicos (DESSEN *et al.*, 2001). Di Fabio, e colaboradores (2001), confirmam com o aumento de resistência de 20% em crianças com doença invasiva causada pelo pneumococo. O aumento da resistência de pneumococo aos antimicrobianos tem sido identificado em isolados invasivos e não invasivos do *S. pneumoniae*, apresentando variação regional e geográfica em sua prevalência (AMERICAN ACADEMY OF FAMILY PHYSICIANS, 2004). De acordo com dados do SIREVA da Argentina, Uruguai e Brasil, a taxa de resistência à penicilina observada em crianças com meningite é menor que nas com pneumonia (BRANDILEONE, 2007). Assim, cada região deve conhecer a sua incidência e distribuição clonal dos *S. pneumoniae*, para melhor adequar sua terapêutica (CANDIANI, 2004).

O processo de aumento da resistência aos β -lactâmicos é gradual e pode ser observado nos valores de concentração inibitória mínima (CIM). Desde os anos 90, a diminuição da susceptibilidade à penicilina tem sido descrita em vários países, com prevalência de valores acima de 40% (SCHRAG *et al.*, 2004). Alguns estudos confirmam: 70% na China (MUNOZ, *et al.*, 1992), 70% na Coréia (LEE, *et al.*, 1995), 12% no Canadá, 29% na Grécia (SYROGIANNOPOULOS, *et al.*, 1997) e 52% na Espanha (KAPLAN, *et al.*, 2004). Já na última década a resistência à penicilina foi de 45% no EUA (ROSSONI *et al.*, 2008). Brandileone e colaboradores (2006) observaram um aumento significativo da resistência total

(30%) e resistência intermediária (61%) à penicilina em isolados de amostras no Brasil.

Para os casos de resistência às cefalosporinas de terceira geração, a literatura sugere antimicrobianos alternativos, como a associação dessas cefalosporinas à rifampicina e carbapenêmicos ou quinolonas (UNIPP, 2010).

Farrel (2004) relata que a resistência aos macrolídeos também é um motivo de preocupação epidemiológica. Vários estudos sugerem ligação entre a resistência pneumocócica aos macrolídeos e a falha terapêutica em pacientes hospitalizados que adquiriram a infecção na comunidade (RZESZUTEK *et al.*, 2004). Em alguns casos de resistência, há predominância de sensibilidade intermediária em relação à resistência total (ROSSONI *et al.*, 2008). O uso da antibioticoterapia em casos de pneumonia, otite média e infecções de orofaringe, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de resistência em meningites decorrentes destas infecções (AMERICAN ACADEMY OF FAMILY PHYSICIANS, 2004).

A resistência múltipla a antimicrobianos, ou multirresistência, ocorre paralelamente à resistência à penicilina (BRANDILEONI *et al.*, 2006). Segundo alguns pesquisadores, a resistência do pneumococo a outros β -lactâmicos está diretamente correlacionada com o nível de resistência à penicilina. Esta resistência cruzada, inclusive em celalosporinas de terceira geração, é motivo de grande preocupação em saúde pública (IAL, 2010).

A não disponibilidade, na maioria dos casos, do resultado da CIM é a realidade nas instituições do nosso país que prestam assistência à população infantil. Tal fato dificulta a escolha da antibioticoterapia que acaba por ser influenciada somente pela resistência identificada por método de disco difusão. O emprego do disco de oxacilina não fornece indicação definitiva da resistência do pneumococo à penicilina e mesmo o método de definição de sensibilidade da CIM usa apenas critérios laboratoriais (VENGLARCIK, 2000; MAGALHÃES, 2001; CLSI, 2008; IAL, 2010).

3.10 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO

3.10.1 Identificação Laboratorial

As amostras de LCR devem ser semeadas em ágar chocolate e ágar sangue, incubado em tensão de CO₂ durante 24 a 48 horas. O crescimento em ágar sangue, com hemólise parcial do meio (α -hemólise), além de características morfológicas macroscópicas observadas no ágar chocolate auxilia na identificação de pneumococo. Além disso, o teste de catalase negativo, a solubilidade em bile e a sensibilidade à optoquina, são dados laboratoriais que evidenciam a identificação e confirmação de *S. pneumoniae* causando a infecção (IAL, 2010).



FIGURA 2 – TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OPTOQUINA

LEGENDA – a) disco com concentração 4µg de optoquina

FONTE – A autora, 2010.

Alguns pesquisadores têm descrito problemas no diagnóstico da meningite bacteriana aguda, em casos de pacientes que foram tratados com antimicrobianos previamente a coleta de LCR, como dificuldade na fixação do cristal violeta na técnica de Gram e diminuição da sensibilidade de aglutinação do látex. As amostras apresentam resultados falsos negativos e não crescimento bacteriano ou crescimento fastidioso durante os testes de identificação

microbiológica (LEE *et al.*, 2003). Entretanto, esfregaços de fluídos corpóreos corados pela coloração de Gram, ainda são de grande valia para o diagnóstico da doença por pneumococo (IAL, 2010).

3.10.2 Análise da Diversidade Genética

Em termos epidemiológicos, micro-organismos envolvidos em um surto são clonalmente relacionados, tendo em comum fatores de virulência, características bioquímicas e genéticas. Entretanto, existe diversidade suficiente dentro de uma mesma espécie para que micro-organismos isolados em diferentes tempos e regiões geográficas possam ser classificados dentro de sorotipos (OLIVE, BEAN, 1999).

A biologia molecular possibilita um grande poder de diferenciação entre os isolados da mesma espécie. Assim, possibilita novas classificações, além da descrição de um perfil cromossomal de maior relação com as formas graves da infecção (ALVES, 2003; GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2003).

González-Rey e pesquisadores (2003) mencionam que um método que permita chegar até esses subtipos dentro de uma espécie deve apresentar alto poder discriminatório. Alguns autores confirmam o achado e mencionam a técnica de *Pulsed Field Gel Eletrophoresis* (PFGE) como uma grande ferramenta para a análise do DNA na tipificação dos isolados, na examinação dos sorotipos mais prevalentes (ARBEIT *et al.*, 1998) e investigação de surtos (LEE, PEPPE, GEORGE, 1998). A metodologia é trabalhosa e são necessários pelo menos cinco dias para encerrar o protocolo (GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003).

No PFGE a análise é cromossomal. Todo o material genético é digerido por uma enzima de restrição que faz o reconhecimento de sequências raras, formando grandes fragmentos. Para a digestão do material genético de *S. pneumoniae*, a enzima *SmaI* tem sido bastante utilizada devido à sequência C+G ser menos frequente (DUARTE *et al.*, 2005).

Tenover e seus colaboradores (1995) descreveram as prováveis formas de interpretação da posição das bandas dentro do perfil eletroforético. De acordo

com a diferença de bandas e o posicionamento destas, é possível determinar quais os eventos genéticos (deleção, inserção e mutações pontuais) ocorreram e assim distinguir os perfis.

Duarte e seus colaboradores (2005) apontam o PFGE pela exatidão na diferenciação dos clones, evidenciando bandas mais homogêneas que as técnicas utilizadas anteriormente, como a *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Soriano e pesquisadores (2008) utilizaram a técnica de PFGE para análise visual dos perfis de macrorestrição de amostras de pneumococo resistentes oriundas dos países Romênia e Polônia.

A técnica de PFGE tem sido utilizada em estudos que visam caracterização genética e epidemiológica dos *S. pneumoniae*, promovendo a pesquisa de clones ou parentescos, e assim, o rastreamento de cepas dentro de comunidades. Em casos de suspeita de surtos ou epidemias, é a técnica com o maior poder discriminatório entre os isolados, pela possibilidade de avaliação da disseminação clonal de cepas virulentas em uma família, hospital ou comunidade (YAN *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-REY *et al.*, 2003). Porém, este método ainda não é utilizado em laboratórios de rotina, dificultando o rastreamento de isolados, impossibilitando o controle da disseminação e morbimortalidade por estes micro-organismos (ALVES, 2003).

A técnica caracteriza-se por macro-restrição de eletroforese em campo pulsado e a análise cromossomal do padrão de restrição de DNA possibilita o estudo genético dos isolados. As informações geradas pelo PFGE podem auxiliar os clínicos no reconhecimento de casos de re-infecção por um novo genótipo, ou alertando para a possibilidade de achados de clones que apresentem o fenômeno de tolerância ao tratamento preconizado (TENOVER *et al.*, 1995; ALVES, 2003). Enquanto a eletroforese convencional é limitada à análise de fragmentos de até 50Kb, o PFGE separa fragmentos de 1500Kb. Isto é possível pela alternância periódica do campo elétrico, forçando permanentemente as moléculas a modificarem a orientação da corrida. Os eletrodos que constituem o campo elétrico do PFGE são dispostos em um hexágono.

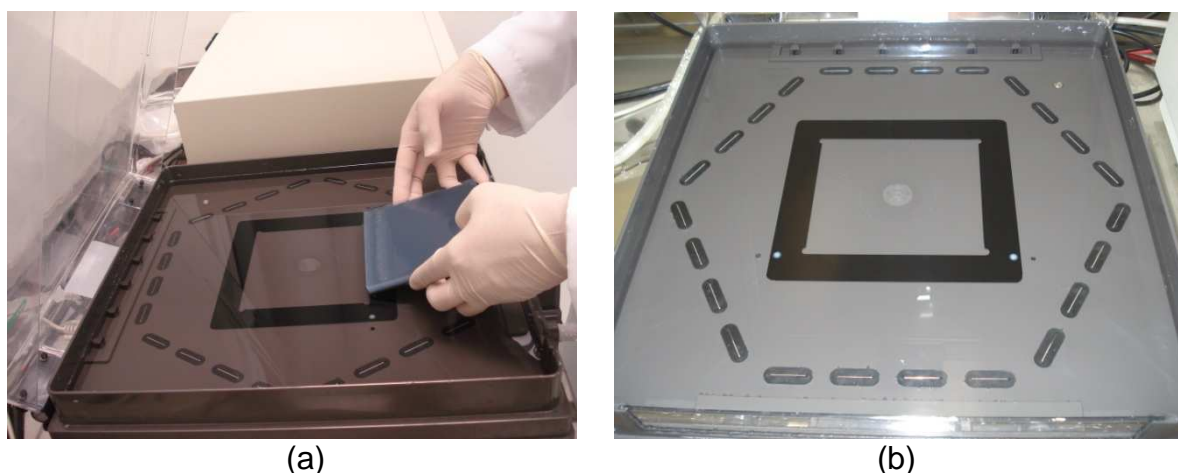


FIGURA 3 - CUBA ELETROFORÉTICA COM ELETRODOS EM POSIÇÃO HEXAGONAL
 LEGENDA – (a) posicionamento do gel de agarose, (b) gel de agarose no interior do campo elétrico.

FONTE – a autora (2009).

3.10.3 Identificação de Resistência

Os métodos laboratoriais podem prever o sucesso do tratamento, ao testar *in vitro* a sensibilidade da bactéria frente aos antimicrobianos, como o método de difusão em disco e a determinação da CIM, através da macrodiluição em tubo, a microdiluição em placa e o E-test (*Epsilon-meter-Test*) (IAL, 2010).

O E-test é um método semi-quantitativo baseado no princípio do disco difusão, tendo o gradiente de concentração do antimicrobiano padronizado em uma tira de plástico. Através de sua diluição em ágar, é possível avaliar a concentração necessária para inibir o crescimento visível da bactéria em meio de cultivo (CLSI, 2008; CDC, 2010).

Em critérios de confiabilidade, rapidez e simplicidade de execução, o método de E-test é o mais indicado, entretanto apresenta um custo elevado. A concordância na definição da CIM para o pneumococo, realizada pelo E-test e a microdiluição em caldo atingiu níveis superiores a 80% (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1997; BOLMSTROM, *et al.*, 1998; IAL, 2010).

O CIM dos diferentes antimicrobianos foi padronizado por pesquisadores do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para os diferentes micro-organismos, servindo como referência para se avaliar o grau de resistência de *S. pneumoniae* (CLSI, 2008).

3.10.4 Identificação de Genes de Resistência

O desenvolvimento de métodos moleculares para o diagnóstico rápido de isolados resistentes e o melhoramento da detecção de micro-organismos relacionados à infecção bacteriana aguda, foi o foco nos últimos anos (WELINDER-OLSSON *et al.*, 2007).

Considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária, o *Polymerase Chain Reaction* (PCR) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos. A técnica consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos e obtenção da amplificação de um gene específico (PCR, 2010). Explora a função natural da enzima Taq-polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, que, ao reconhecer o *primer*, sintetiza uma cópia complementar, obedecendo a informação contida na sequência de DNA, que será então replicada e amplificada (PCR, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram incluídas no estudo, amostras de LCR de pacientes, recebidas no Laboratório Central do Estado (LACEN), provenientes de diversos hospitais do Estado do Paraná, com suspeita de meningite, no período de maio de 2007 a outubro de 2009. As amostras foram recebidas em dois frascos, tendo em um ágar chocolate suplementado inclinado e no outro, sem meio de cultura, para a realização da prova de aglutinação por partículas de látex (Centro de Produção de Produtos Imunobiológicos – CPPI, Piraquara, PR). Dados adicionais do paciente foram levantados como: região geográfica, idade e sexo.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética do Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba-PR.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE *S. pneumoniae*

As amostras recebidas foram semeadas em ágar chocolate, preparado com base de Mueller-Hinton (OXOID®, Inglaterra) suplementado com 5% de sangue de carneiro (NEWPROV, Pinhais, PR) pelo Centro de Produção de Produtos Imunobiológicos (CPPI), Piraquara, PR. As placas foram incubadas em atmosfera de 5 a 10% de CO₂ em temperatura de 35,5 a 36⁰ C, por 48 horas (CLSI, 2008). O comportamento α hemolítico em ágar sangue, além da caracterização Gram positivo pela coloração de Gram, catalase negativa, foram utilizados no direcionamento da identificação.

As colônias suspeitas foram submetidas ao teste de optoquina (etil-hidrocupreína hidrocloreídrica) utilizando um disco de optoquina, de concentração de 4 μ g (NEWPROV, Pinhais, PR), sobre o inóculo bacteriano e seguindo as mesmas condições atmosféricas do isolamento, porém em um período de 24

horas. O aparecimento de uma zona de inibição ≥ 16 mm em volta do disco é considerado como teste presuntivo positivo para o *S. pneumoniae* pela presença da lise celular do micro-organismo (LUND, HENRICHSEN, 1978; CLSI, 2008; IAL, 2010).

Os isolados foram armazenados em caldo Todd - Hewitt contendo sangue de carneiro desfibrinado (CPPI, Piraquara, PR), em freezer - 80°C.

4.3 ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS

Para auxiliar a identificação presuntiva, foi utilizado o disco de optoquina (NEWPROV, Pinhais, PR) de 4µg sobre o inóculo bacteriano.

Para avaliação de susceptibilidade à penicilina, utilizou-se o disco de oxacilina com concentração de 1µg (OXOID®, Inglaterra).

Antimicrobianos testados pela técnica D-test: clindamicina (2µg) e eritromicina (15µg) para a confirmação de resistência aos macrolídeos.

Antimicrobianos testados pelo teste Epsilométrico (E-test®): ceftriaxona (0,02 a 32µg/ml), clindamicina (0,016 a 256µg/ml), eritromicina (0,016 a 256 µg/ml), meropenem (0,002 a 32,0 µg/ml), penicilina (0,016 a 256 µg/ml), vancomicina (0,016 a 256µg/ml) e ciprofloxacina (0,002 a 32,0 µg/ml), que correspondem aos antibióticos de escolha para tratamento de infecções pneumocócicas.

4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR DISCO-DIFUSÃO

Em ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro para a susceptibilidade à oxacilina com concentração de 1 µg (OXOID®, Inglaterra) e incubação à temperatura de 35,5 a 36°C, por 20 a 24 horas, em condições de 5 a 10% de CO₂. Após esse período foi determinada a leitura do halo de inibição do crescimento (SWENSON *et al.*, 1986; CLSI, 2008). De acordo com o método de

Kirby-Bauer, os isolados que apresentaram zona de inibição inferior à 19mm foram classificados como resistentes. Isolados classificados como intermediários e resistentes à oxacilina foram considerados como não susceptíveis à penicilina (ROSSONI *et al.*, 2008; CLSI 2010).

4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE POR DISCO APROXIMAÇÃO (D-test)

O fenótipo de resistência aos macrolídeos (cMLS_B, iMLS_B) foi determinado pela técnica de disco aproximação – D-test (FIGURA 6), utilizando discos de eritromicina (15µg) e clindamicina (2µg), colocados a 20mm de distância entre si, na placa de água Muller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro. O fenótipo cMLS_B é definido como resistência a ambos os antimicrobianos. No fenótipo iMLS_B há resistência à eritromicina, susceptibilidade à clindamicina e D-test positivo, e o fenótipo M será definido como resistência à eritromicina, susceptibilidade à clindamicina e D-test negativo. Nos casos do teste apresentar-se como positivo, o halo de inibição de clindamicina sofre um achatamento na região adjacente ao halo de inibição formado envolta ao disco de eritromicina, gerando uma resistência indutiva à clindamicina. Assim, tratamentos utilizando clindamicina em infecções de *S. pneumoniae* que carregam o gene *erm* podem levar a falha terapêutica (DESJARDINS *et al.*, 2004; CLSI, 2009).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CIM PELA TÉCNICA DE E-TEST (*Epsilometer-test*)

Para o estudo, seguiu-se o método de E-test em ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro (NEWPROV, Pinhais, PR), utilizando as tiras de E-test (AB BIODISK, Piscataway, New Jersey, USA).

4.7 REAÇÃO DE NEUFELD-QUELLUNG

Utilizando anti-soros específicos, provindos do *Statens Serum Institut Copenhagen Denmark*, a reação ocorre com os antígenos capsulares. As características imunológicas e antigênicas dos polissacarídeos capsulares são os critérios para o agrupamento dos isolados (BRANDILEONE, 1999; ROSSONI, 2003).

A observação da reação é realizada em microscópio ótico, em lente de aumento (1000X), utilizando óleo de imersão. É necessário um pequeno esfregaço de cultura em uma lâmina de vidro, uma gota de anti-soro e uma gota de solução de azul de metileno a 0,3% para a reação. A presença do pneumococo com aumento capsular e refringência modificada, dita reação entre o PS e o anti-soro específico.

Para a realização da sorotipagem, os isolados foram encaminhados para o IAL, São Paulo. As amostras foram enviadas semeando-se em ágar chocolate suplementado e inclinado em um frasco.

4.8 TÉCNICA DE PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Os isolados cultivados em placas de ágar sangue tryptose (Newprov) por 20-24 horas de incubação, sob tensão de CO₂, foram utilizados para, a partir de uma única colônia, a realização de um novo cultivo. Após um novo período de 24 horas, as células bacterianas estão na condição ideal para a extração do DNA. Cerca de cinco colônias foram utilizadas para o preparo de uma suspensão em caldo THB, para mais um dia de cultivo, nas mesmas condições atmosféricas já citadas. Para aumentar o concentrado bacteriano, centrifugou-se a suspensão por 5 minutos, a 3000 rpm e então transferiu-se 1,5 ml do sedimento formado para o *eppendorf*. Houve centrifugação nas seguintes condições: 4^o C, a 5000 rpm, por 4 minutos. O sobrenadante gerado foi descartado e o tampão PIV (10mM Tris-HCl, 1M NaCl) foi utilizado a cada centrifugação posterior. Os volumes foram do

tampão seguiram na ordem: 1000µl, 500µl e finalmente 200µl, o qual não foi mais descartado. Em temperatura de 51^o C, os 200µl de suspensão bacteriana recebeu 200 µl de ágarose low-melting 2% (NuSieve GTG ágarose; FMC Bioproducts, Rockland, ME).

Para o início do preparo dos *plugs*, utilizou-se um “pente” como molde. Os *plugs* foram incubados em banho-maria a 37°C e imersos em uma solução de lise (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,2% sodium deoxycholate, 0,5% sodium laurylsarcosine, 0,5% Brij 58) com 1mg/ml de lisozima e 5U/ml de mutanolisina para a lise da parede celular bacteriana e liberação do material genético.

Após overnight, o tampão de lise foi descartado e os *plugs* foram novamente incubados em banho-maria, porém a 51°C em solução ES (0,5M EDTA, 1,0% sodium laurylsarcosine) contendo proteinase K (0,1mg/ml).

No terceiro dia de experimento, os *plugs* foram lavados quatro vezes com duração de uma hora cada, em tampão TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA), sob agitação constante.

Ao quarto dia de preparo, apenas um bloco por amostra foi selecionado, os demais ficam armazenados em tampão TE a 4°C. Os *plugs* selecionados, sofrem a ação da enzima *Sma*I (Boehringer Mannheim), a qual revela-se como única enzima de restrição utilizada no método de PFGE. Durante 24 horas, os *plugs* ficaram em banho-maria a 30°C.

No quinto dia, o gel foi confeccionado a partir de 1,1% de ágarose (Seakem GTG ágarose, FMC Bioproducts) em tampão TBE 0,5X (1M Tris, 0,01M EDTA, 1M ácido bórico). Os *plugs* foram retirados da enzima *Sma*I e inseridos ao gel de corrida imediatamente. O gel de corrida foi transferido para a cuba eletroforética (FIGURA 3).

O equipamento utilizado para a técnica de PFGE é o aparelho CHEF DR III (BioRad Laboratories, Hercules, CA). A programação da corrida do PFGE foi baseada em metodologias já utilizadas: com tempo inicial de transmissão de 5s, tempo final de transmissão de 35s, pelo período de 21h em 6 Vcm⁻¹, temperatura do tampão TBE 0,5X de 12°C e em um ângulo de 120°.

Para a revelação do gel e observação de fragmentos de restrição, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio por 20 minutos. Finalmente o gel foi fotografado em um transiluminador de luz ultravioleta.

A metodologia utilizada para a confecção dos *plugs* foi baseada na d'Oliveira (2003) com algumas adaptações.

4.9 TÉCNICA DE PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

4.9.1 Técnicas de Extração do DNA Bacteriano

Foram testadas três técnicas de extração do DNA bacteriano: quente/frio, quente/frio duplo e enzimática, a fim de verificar qual se adequava mais a metodologia utilizada. Cinco isolados positivos para o gene *erm B*, juntamente com uma cepa padrão, foram utilizados para a análise comparativa (FIGURA 8).

4.9.1.1 Extração enzimática

A partir de crescimento bacteriano puro em ágar chocolate suplementado, suspendeu-se o material em 300µl de NaCl à 0,85% até atingir a escala 0,6 Mc Farland. A suspensão obtida foi exposta ao calor de 70° C por 15 minutos. Seguiu-se ao *Spin down*. Centrifugou-se por 2 minutos em uma microcentrífuga e retirou-se o sobrenadante através de uma pipeta. Para o sedimento, o mesmo foi ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris, EDTA de 1mM, pH 8,0) contendo as enzimas: mutanolisina 10 µl (3.000 units/ml), hialuronidase 2µl (30mg/ml, Sigma H-3506, 300-750 units/mg) e realizada a incubação à temperatura de 37°C durante 30 minutos. Após, transferiu-se os eppendorf para 100° C por 10 minutos e finalmente realizou-se então armazenado em 20° C negativos.

4.9.1.2 Extração quente/frio

Partindo de crescimento bacteriano puro em ágar chocolate suplementado, preparou-se uma suspensão bacteriana 0,6 Mc Farland em 300µl de água ultra-filtrada. Em seguida a suspensão foi submetida a 94 °C durante 10 minutos. Finalmente, transferida ao freezer 20°C negativos durante mais 10 minutos. A extração foi armazenada em 20° C negativos.

4.9.1.3 Extração quente/frio dupla

Nesta extração, a metodologia é a mesma que a quente/frio, acrescentando somente uma repetição do ciclo. Armazenou-se em 20° C negativos.

4.10 CONTROLE DE QUALIDADE

Para o controle de qualidade dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619) e pesquisa de genes de resistência aos macrolídeos (cepas padrão genes *erm A*, *erm B*, *mef A*).

5 RESULTADOS

5.1 UNIVERSO DE AMOSTRAS

No período de maio de 2007 a outubro de 2009, foram recebidas 3.716 amostras de LCR de pacientes com suspeita de meningite bacteriana, viral ou fúngica.

5.1.1 Positividade das Amostras

Do total de 3.716 amostras, 12,7% (474) positivaram para a presença de algum micro-organismo (TABELA 1). Dessas, 184 apresentaram o isolamento do *S. pneumoniae*. As restantes (3.242) negativaram para patógenos fúngicos e bacterianos.

5.1.2 Micro-organismos Isolados

O micro-organismo mais encontrado no presente estudo foi o *Streptococcus pneumoniae*, compreendendo 38,8% dos isolados no período estudado, seguido de *Neisseria meningitidis* (36,7%), *Cryptococcus sp* e *Streptococcus sp.* (3,2% cada) e *Acinetobacter baumannii* (2,1%).

TABELA 1: MICRO-ORGANISMOS ENCONTRADOS

Micro-organismo	N	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	184	38,82
<i>Neisseria meningitidis B</i>	174	36,70
<i>Cryptococcus sp.</i>	15	3,16
<i>Streptococcus sp</i>	15	3,16
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	2,11
<i>Streptococcus epidermidis</i>	10	2,11
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	1,90
<i>Haemophilus influenzae</i>	8	1,69
<i>Streptococcus grupo A</i>	8	1,69
<i>Staphylococcus sp.</i>	7	1,48
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1,05
<i>Escherichia coli</i>	5	1,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	1,05
<i>Listeria spp.</i>	4	0,84
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	0,84
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0,63
<i>BGP</i>	2	0,43
<i>Candida sp.</i>	2	0,43
<i>Serratia marcescens</i>	2	0,43
<i>Staphylococcus não saprophyticus</i>	2	0,43
TOTAL	474	100

5.2 ASPECTOS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

5.2.1 Características Demográficas

Nesta casuística, 38,8% dos isolados provinham de pacientes residentes em Curitiba. Os 62,0% restantes totalizam casos de cidades do interior do Paraná, tendo a cidade de Ponta Grossa um índice de 8,2%, seguida de 6,1% na cidade de Francisco Beltrão (GRÁFICO 1).

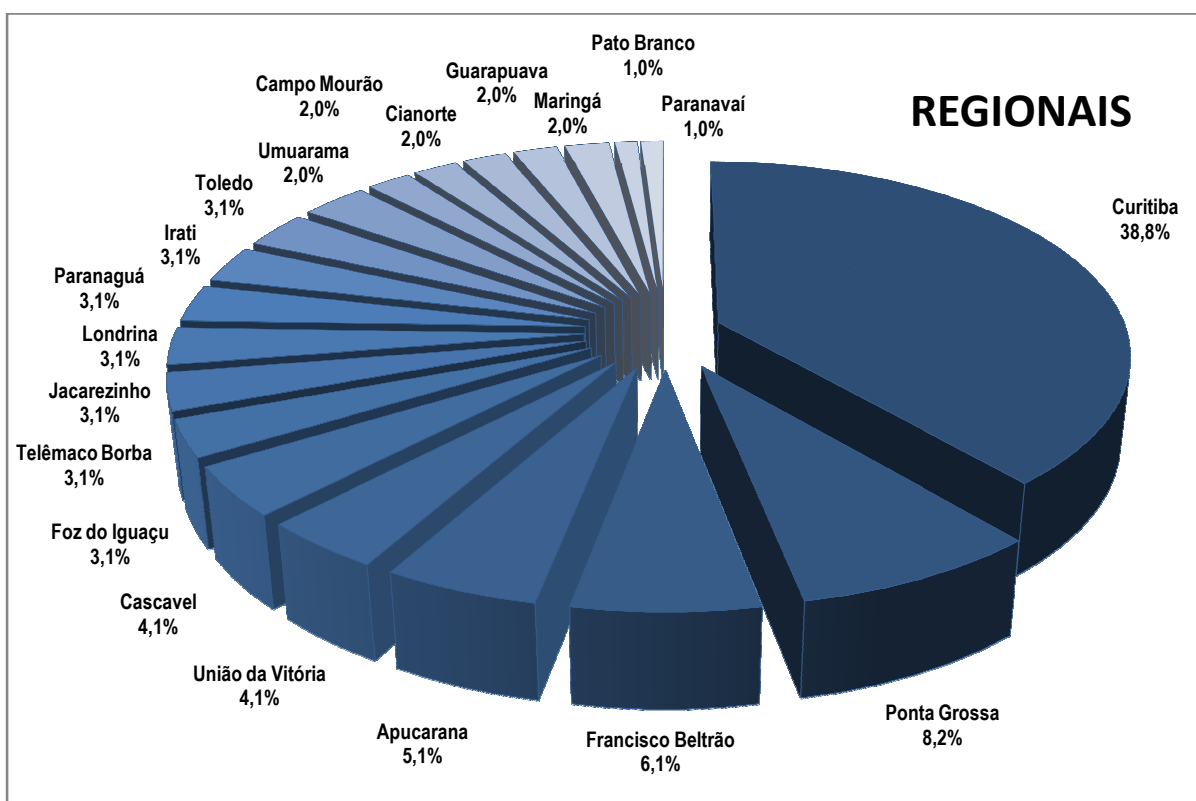


GRÁFICO 1: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DOS ISOLADOS

5.2.2 Distribuição Sazonal

Nos meses de inverno ocorreu um aumento no isolamento de *S. pneumoniae* (GRÁFICO 2).

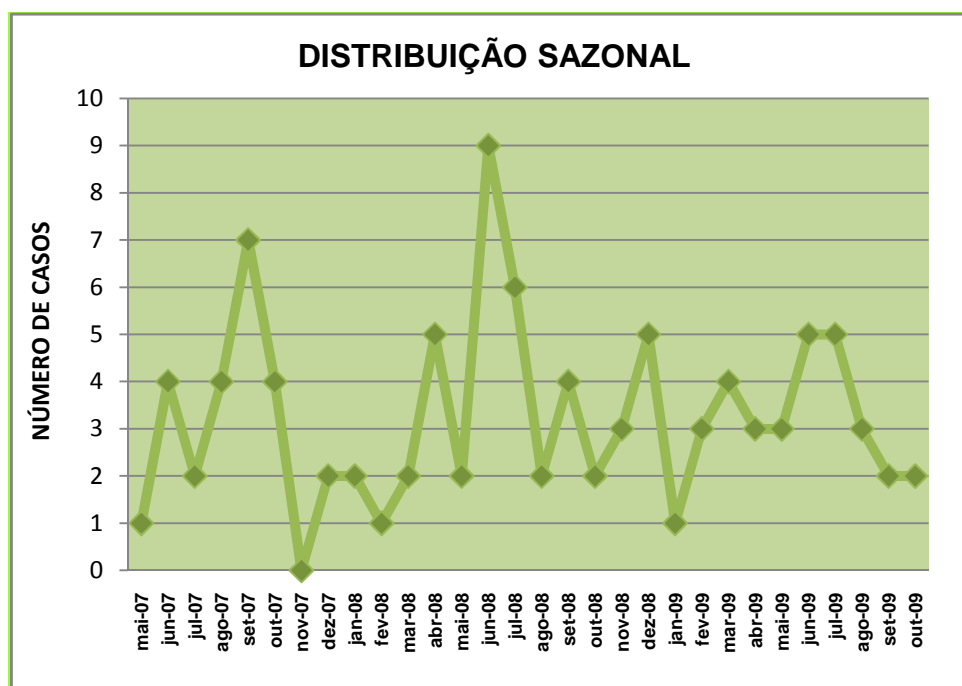


GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DOS ISOLADOS DE *S.pneumoniae*

5.2.3 Distribuição por Sexo e Faixa Etária

No presente estudo, 56/98 amostras são de pacientes do sexo masculino e 42/98 do sexo oposto. A faixa etária predominante foi a de crianças de até dois anos de idade, seguida de pacientes com 20 a 50 anos (TABELA 2).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE *S. pneumoniae* POR FAIXA ETÁRIA.

Idade (anos)	N	%
Até 2	29	29,5
3-5	8	8,2
6-19	15	15,3
20-50	28	28,6
>50	18	18,4
TOTAL	98	100

5.3 SOROTIPOS ENCONTRADOS

Os sorotipos encontrados foram: 1 (2%), 3 (3%), 4 (2%), 5 (1%), 6A (4%), 6A/C (4%), 6B (13%), 7F (2%), 8 (1%), 9N (1%), 9V (3%), 12F (5%), 13 (3%), 14 (14%), 15B (3%), 15C (1%), 17F (1%), 18B (1%), 18C (6%), 19A (4 %), 19F (9%), 22F (5%), 23F (4%), 24F (1%), 34 (1%), 35F/47F (1%) e 38 (1%). Amostras não reagente totalizaram 4% (GRÁFICO 3).

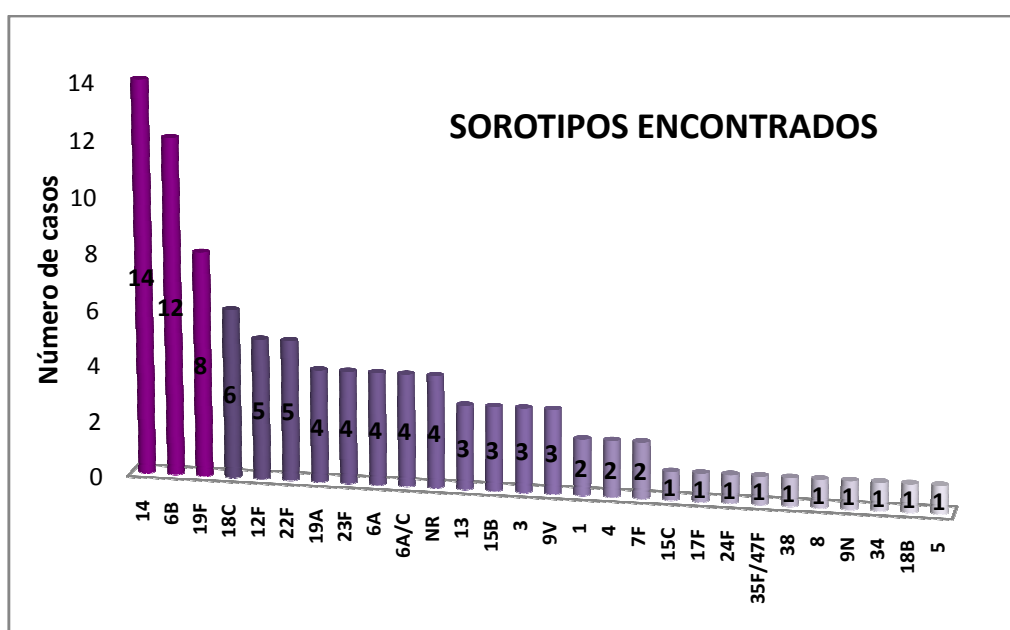


GRÁFICO 3 - INCIDÊNCIA DOS SOROTIPOS

5.4 ANÁLISE DE RESISTÊNCIA

5.4.1 Análise Epidemiológica de Resistência

Na avaliação da incidência de casos de resistência do pneumococo à penicilina, as regiões noroeste, centro ocidental, oeste, sudoeste, norte central, centro sul, sudeste paranaenses, e a mesorregião metropolitana de Curitiba do Estado do Paraná apresentam positividade (FIGURA 4). As cidades e o número de casos totalizaram 36 casos de resistência: Curitiba, com 16 casos (47,2%), Francisco Beltrão, Ponta Grossa, Cascavel, 3 casos (8,7%) cada e Foz do Iguaçu, 2 casos (5,8%). As cidades: Apucarana, Campo Mourão, Guarapuava, Irati, Maringá, Paranaguá, Paranavaí, Pato Branco e União da Vitória apresentaram um caso cada (2,9%).

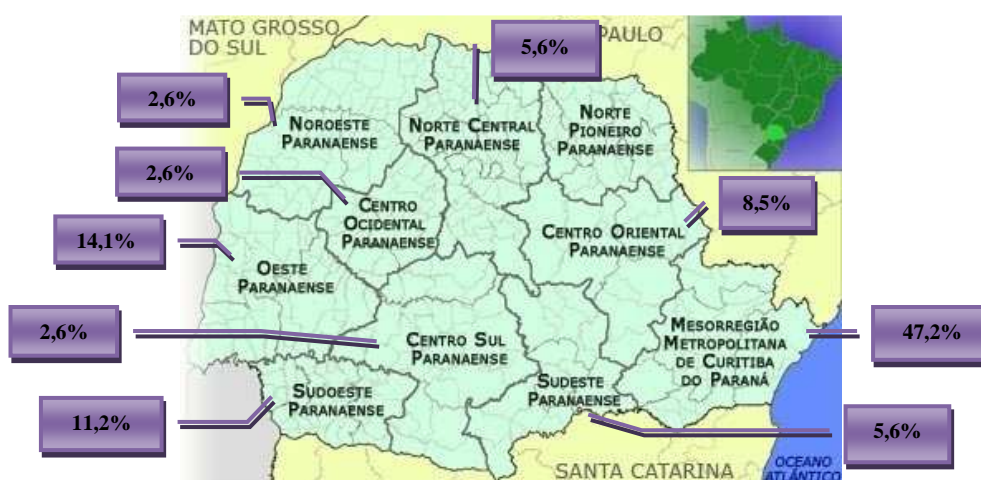


FIGURA 4 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ E A INCIDÊNCIA DE RESISTÊNCIA À PENICILINA

LEGENDA – Porcentagem de incidência por região

FONTE – a autora (2010)

Na avaliação da faixa etária dos pacientes que apresentaram infecção por pneumococo resistente à penicilina foram encontrados 17 casos (47,2%) com idades de 6 a 60 anos, 15 casos (41,7%) de crianças menores de cinco anos e

somente 4 casos (11,1%) eram idosos acima de 60 anos. No estudo do sexo dos pacientes, 19 (52,8%) eram do sexo masculino e 17 (47,2%) do sexo feminino.

Os três sorotipos mais frequentes (14, 6B e 19F) foram os responsáveis por 66,6% dos isolados resistentes à penicilina (TABELA 3) e o sorotipo 6B, o segundo mais frequente destacou-se no número de isolados resistentes aos macrolídeos (TABELA 4).

TABELA 3 – RESISTÊNCIA À OXACILINA X SOROTIPO.

Sorotipo	6B		14		19F		Total	
Susceptibilidade	N	%	n	%	n	%	n	%
Sensível	3		4		3		10	
Resistente	9	13,7	10	15,3	5	7,7	24	36,7
TOTAL	12		14		8		34	

Para a avaliação de resistência do pneumococo aos macrolídeos, os casos foram isolados nas regiões oeste, sudoeste, sudeste paranaenses, bem como a mesorregião metropolitana de Curitiba do Estado do Paraná (FIGURA 5). As cidades e o número de casos são: Curitiba (5), Francisco Beltrão (2), Cascavel, Foz do Iguaçu, Pato Branco e União da Vitória (1) cada.



FIGURA 5 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ E A INCIDÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS

LEGENDA – Porcentagem de incidência por região.

FONTE – adaptações da autora à fonte do site Paraná.com (2010).

TABELA 4 – RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS X SOROTIPO.

Sorotipo	6B		14		19A		19F		23F		TOTAL	
	N	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
Sensível	5		13		3		7		3			
Resistente	7	7,1	1	1,0	1	1,0	1	1,0	1	1,0	11	11,2
TOTAL	12		14		4		8		4			

5.4.2 Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos

5.4.2.1 Disco difusão

No teste de susceptibilidade à penicilina, 63,3% dos isolados se apresentaram sensíveis e 36,7% resistentes à penicilina.

5.4.2.2 Disco aproximação (D-test)

Dos 98 isolados estudados, 11 apresentaram resistência aos macrolídeos. Desses, 10 (90,9%) manifestaram a resistência do tipo constitutiva. Já a indutiva manifestou-se em apenas uma amostra (9,1%).



FIGURA 6 – SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE D-Test
 LEGENDA – Avaliação da formação de halo de sensibilidade à clindamicina e à eritromicina.

FONTE – A autora (2010).

5.4.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A susceptibilidade aos antimicrobianos mais utilizados para o tratamento das infecções causadas pelo *S. pneumoniae* foi avaliada através da técnica de E-test (FIGURA 7).

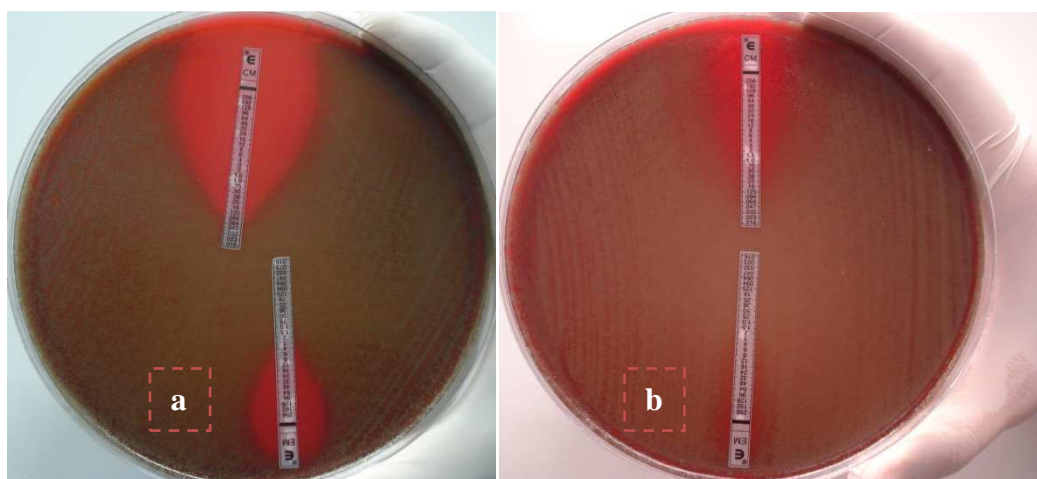


FIGURA 7 – CIM DOS ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE E-TEST

LEGENDA – a) sensibilidade à clindamicina e resistência à eritromicina – *mef A*, b) resistência à clindamicina e à eritromicina – *erm B*.

FONTE – A autora (2010).

No teste de susceptibilidade a penicilina, 59,2% dos isolados se apresentaram sensíveis, 14,3% não sensíveis e 26,5% resistentes à penicilina. Não foi encontrada resistência à vancomicina nem ao meropenem. Porém, dois casos de resistência à ceftriaxona e onze casos de resistência aos macrolídeos foram relatados (TABELA 5).

TABELA 5 – RESISTÊNCIA AOS DEMAIS ANTIMICROBIANOS

	TX	VA	MP	ERI	CLI	CIP
Sensível	85	97	90	85	88	76
Não sensível	11	1	8	2	0	22
Resistente	2	0	0	11	10	0
TOTAL	98	98	98	98	98	98

A avaliação da CIM 50 e CIM 90 (TABELA 6) dos antimicrobianos pela técnica de E-test possibilitou levantar índices de susceptibilidade.

TABELA 6 – CIM 50 E CIM 90 DOS ANTIMICROBIANOS.

	Limite de susceptibilidade (µg/ml)	Escala CIM (µg/ml)	CIM 50 (µg/ml)	CIM 90 (µg/ml)	% Suscep.
Penicilina	≤0,06	≤0,016- >256	0,032	0,50	63,3
Ceftriaxona	≤1,0	≤0,02- > 32	0,032	0,50	97,9
Vancomicina	≤ 1,0	≤0,016->256	0,38	0,50	100
Meropenem	≤ 0,25	≤0,02- >32	0,023	0,19	100
Eritromicina	≤ 0,25	≤0,016- >256	0,064	1,0	88,7
Clindamicina	≤0,25	≤0,016- >256	0,125	0,19	89,8
Ciprofloxacina	≤ 2,0	≤0,02- >32	0,75	1,0	100

5.4.3 Pesquisa de Genes de Resistência

5.4.3.1 Extração de DNA

Os resultados obtidos pelas três técnicas de extração de DNA foram semelhantes. A técnica quente/frio duplo foi a escolhida para a pesquisa de genes de resistência *erm A*, *erm B* e *mef A*.

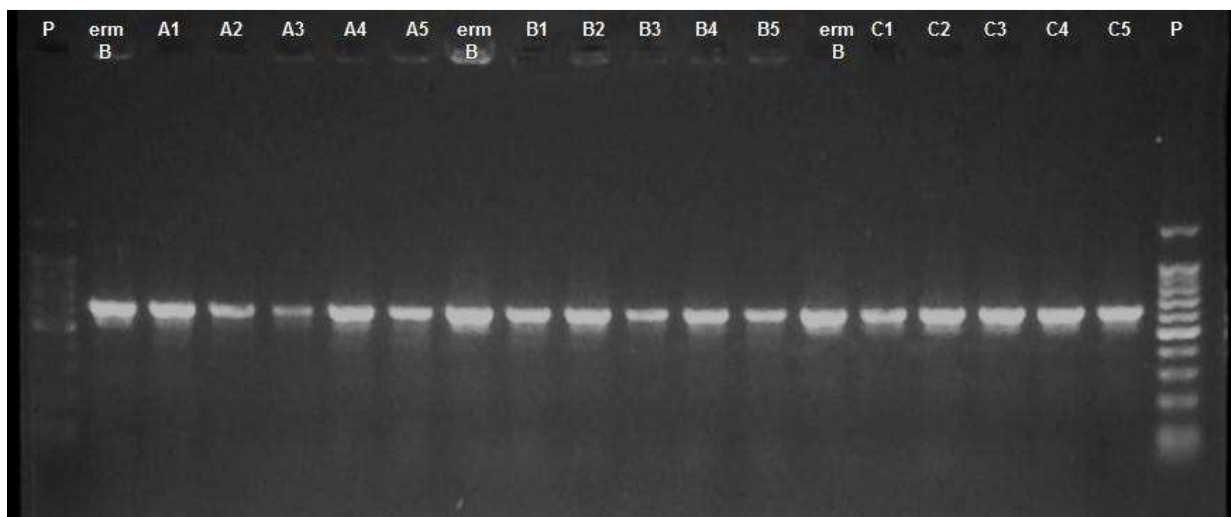


FIGURA 8 - TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Legenda: P: padrão; *erm B*: cepa padrão gene *erm B*; A1 a A5: amostras extraídas pela técnica quente/frio; B1 a B5: amostras extraídas pela técnica de quente/frio duplo; C1 a C5: amostras extraídas pela técnica enzimática.

Fonte: a autora (2010).

5.4.3.2 PCR

Após a realização do teste de disco aproximação (D-test), foi realizado pesquisa de genes de resistência *erm A*, *erm B* e *mef A* nas amostras que apresentaram o fenótipo cMLST e iMLST.

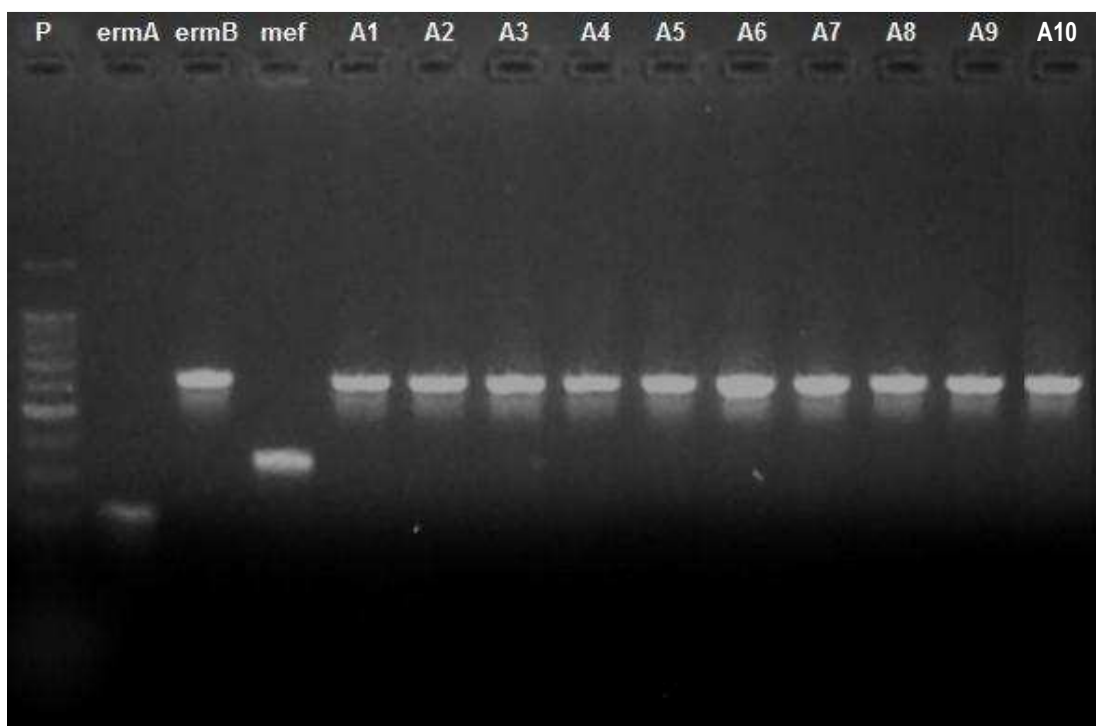


FIGURA 9 - PESQUISA DE GENE DE RESISTÊNCIA *erm B*

LEGENDA – P: padrão, *erm A*: cepa padrão gene *erm A*, *erm B*: cepa padrão gene *erm B*, *mef A*: cepa padrão gene *mef A*, A1 a A10: amostras gene *erm B* positivo.

FONTE - A autora (2010).

Das onze amostras que apresentaram resistência aos macrolídeos no teste fenotípico, dez apresentaram o gene *erm B*, confirmando assim a presença de resistência constitutiva (FIGURA 9). Apenas uma amostra positiva no D-test foi de resistência indutiva e confirmada pela presença do gene *mefA* (FIGURA 10). Nenhuma cepa do estudo revelou a presença do gene *erm A*.

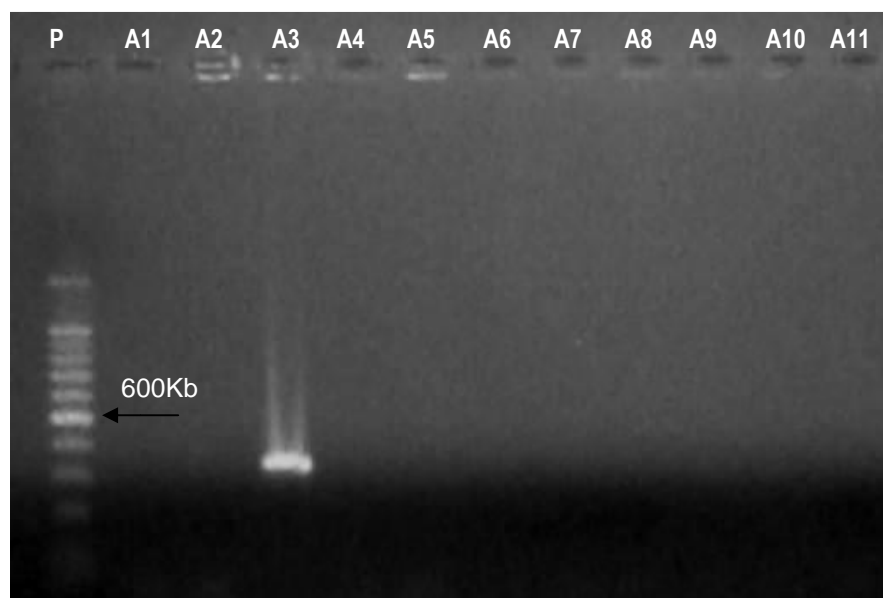


FIGURA 10 - PESQUISA DE GENE DE RESISTÊNCIA *mef A*.

LEGENDA – P: padrão, A1, A2, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10 e A11: amostras gene *mef A* negativo. A3: amostras gene *mef A* positivo

FONTE: A autora (2010).

5.4.4 Pesquisa de Clones

A análise do perfil eletroforético de macrorestrição foi realizada nas onze amostras resistentes aos macrolídeos (FIGURA 11) e nas quatorze amostras pertencentes ao sorotipo mais frequente do estudo (FIGURA 12).

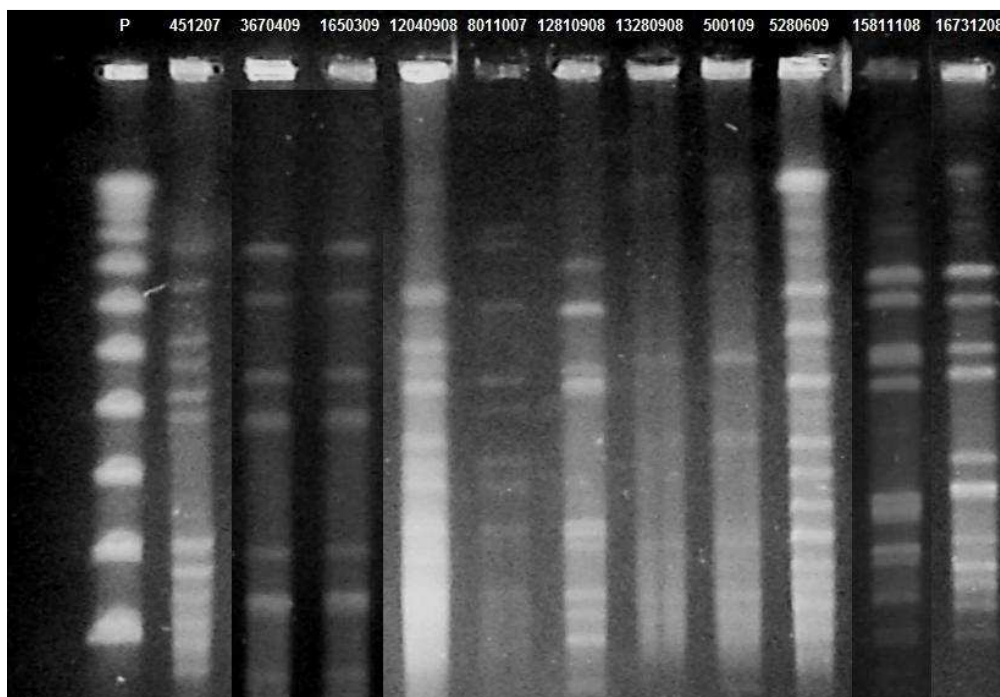


FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE MACRORESTRIÇÃO DAS CEPAS RESISTENTES AOS MACROLÍDEOS.

LEGENDA – P: padrão. Demais numerações: amostras resistentes aos macrolídeos.

FONTE – A autora (2010).

Após análise do perfil eletroforético de macrorestrição, as amostras resistentes aos macrolídeos revelaram a presença de cepas idênticas, identificadas como clone A (3670409/1650309) e clone B (500109/13280908). As cepas do clone A são provenientes da cidade de Curitiba e pertencem ao mesmo sorotipo, 6B. Já as cepas do clone B têm como origem cidades diferentes, porém de próxima distância. As cepas 15811108 e 16731208 foram isoladas na cidade de Curitiba e são possivelmente relacionadas, apesar de pertencerem a sorotipos diferentes. As demais amostras não revelaram proximidade clonal.

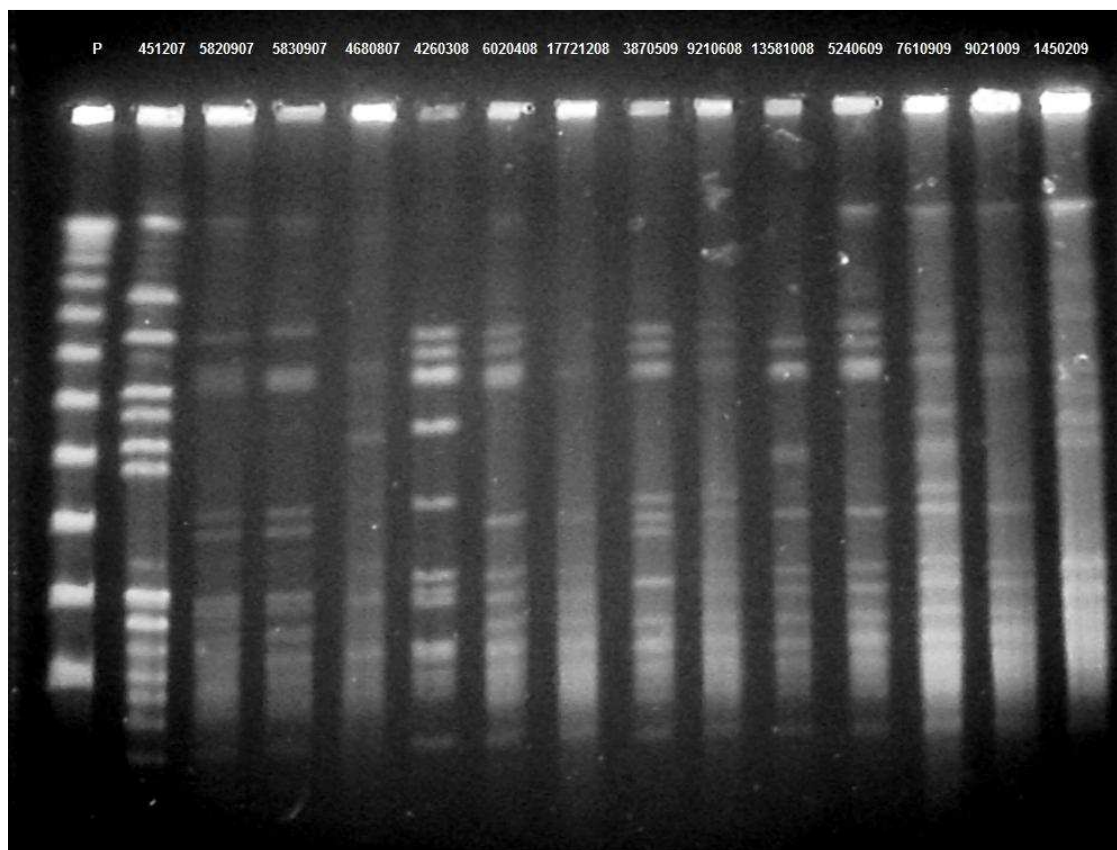


FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE MACRORESTRIÇÃO DOS ISOLADOS DO SOROTIPO 14.

LEGENDA – P: padrão; demais numerações: amostras de sorotipo 14.

FONTE – A autora (2010).

As amostras de sorotipo 14 foram avaliadas pela técnica de PFGE. O padrão eletroforético de macrorestrição obtido revelou a presença de três clones: clone C (5820907/5830907), clone D (6020408/5240609/9021009) e clone E (451207/1450209). Ainda na análise clonal do sorotipo 14, o mais frequente do estudo, identificou-se duas cepas intimamente relacionadas: D1 (13581008) e D2 (9210608).

6 DISCUSSÃO

Em 1997, Schuchat e pesquisadores já citavam o pneumococo como o agente mais identificado em casos de pneumonia, e, desde o uso da vacina contra *Haemophilus influenzae*, estava se tornando o maior agente causador de meningites. Estudos realizados no Canadá (HUSAI *et al.*, 2006) confirmam. Durante o período avaliado, *S. pneumoniae* foi o agente mais prevalente, mas difere do achado de Rossoni (2003), o qual revela *N. meningitidis* como principal agente causador de meningite no Paraná.

A maioria dos isolados de *S. pneumoniae* se concentrou na capital do Estado. De acordo com Hausdorff e colaboradores (2000), os aspectos epidemiológicos da doença pneumocócica variam de uma região para outra, o que determina a necessidade de avaliações locais periódicas para o estabelecimento de estratégias de controle. Variáveis podem estar envolvidas nesse achado. O LACEN localiza-se na cidade de Curitiba e assim, amostras coletadas na cidade e região metropolitana são rapidamente encaminhadas para o referido laboratório. Fatores como exposição a temperaturas e ambientes adversos e o tempo prolongado entre a coleta da amostra até o isolamento da cepa são pouco considerados. Dessa forma, a positividade das amostras aumenta. Já em cidades distantes, esses fatores influenciam muito na viabilidade do micro-organismo. Além disso, enfatiza-se a necessidade do acompanhamento e treinamento de profissionais de saúde envolvidos na coleta e transporte das amostras para minimizar os fatores externos. Em casos de não isolamento, os testes sorológicos garantem o diagnóstico laboratorial.

Na avaliação sazonal das amostras estudadas, os meses de inverno foram os que demonstraram um maior número de casos, indo de encontro às informações fornecidas pelo IAL (2010). Possivelmente, o aparecimento de novos casos é consequência de variações climáticas e ambientes de convívio, como meios de transporte coletivo, creches e escolas.

A porcentagem de isolados de pneumococo provindos de pacientes do sexo masculino foi discretamente maior, tendo semelhança aos dados de Mantese e colaboradores (2003) e Sunakawa e pesquisadores (2010).

O maior número de isolados de *S. pneumoniae* no estudo foi em crianças de até 2 anos, porém todas as faixas etárias, raças e sexos são susceptíveis ao pneumococo (CDC, 2005; IAL, 2010; ANVISA, 2010), tendo vulnerabilidade os imunodeprimidos e portadores de doenças crônicas (ROSSONI *et al.*, 2008). A nível imune, a cápsula polissacarídea é altamente antigênica e tipo-específica. Anticorpos anti-capsulares tipos-específicos contra este antígeno são T-independente, logo não produzem eficientemente anticorpos de alto nível e afinidade, nem induzem as células de memória necessárias para resposta de reforço, particularmente em crianças até 2 anos de idade (IAL, 2010). Além disso, o maior uso de antibióticos na população infantil, muitas vezes de forma inadequada, torna-a mais suscetível às infecções pneumocócicas e o principal reservatório e fonte de transmissão de cepas resistentes (PARADISI, CORTI, CINELLI, 2001).

No presente estudo, o sorotipo mais frequente foi o mesmo encontrado em estudos realizados no Estado do Paraná por Rossoni (2003), bem como em estudos de Brandileone (2007), em âmbito nacional. A determinação dos sorotipos de *S. pneumoniae* é um fator importante para o desenvolvimento e eficácia das vacinas pneumocócicas (HAUSDORFF, 2000). Monitorar a prevalência dos mesmos visa averiguar a necessidade de substituição por vacinas contendo sorotipos ainda não existentes nas atuais (LIPSITCH, 2001; VEENHOVEN *et al.*, 2003). E, como a distribuição dos sorotipos varia entre as regiões geográficas e faixas etárias, é importante, sob o ponto de vista epidemiológico, que se conheçam os sorotipos regionais (ANVISA, 2010).

Dos 27 sorotipos encontrados neste estudo, 17 (1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 22F e 23F) são contemplados na vacina 23-valente, licenciada desde 1983 e ainda utilizada (ROBBINS *et al.*, 1983), e correspondem a 72,4% dos isolados avaliados. Apenas um sorotipo (9V) contemplado na vacina 7-valente, licenciada em 2000 (BLACK *et al.*, 2000; OBARO, 2002), não foi encontrado no presente estudo. Os outros seis presentes na vacina 7-valente (4, 6B, 14, 18C, 19F e 23F) correspondem a 46,7% dos isolados. Em Uberlândia, 90,2% das cepas isoladas de doença invasiva em crianças de até cinco anos de idade estão incluídas na vacina polissacarídica 23-

valente. Comparativamente, 63,6% das mesmas cepas estão contempladas na vacina 7-valente (MANTESE *et al.*, 2003).

Brandileone, em 1999, afirmou que no Paraná existem poucos estudos sobre sorotipos circulantes. Rossoni encontrou 69% de isolados de meningite pneumocócica pertencentes ao grupo de sorotipos mais frequentes no Brasil (ROSSONI *et al.*, 2008).

Sorotipos que causam infecção em crianças, como o 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F, estão associados com resistência aos antibióticos (DAGEN *et al.*, 2003) sendo os sorotipos fortemente envolvidos com as infecções resistentes aos antibióticos tradicionais nos EUA, até a introdução da vacina heptavalente (CDC, 2010). Os sorotipos: 1, 5, 6A/B, 7F/7A, 14, 19A, 19F e 23F são mais predominantes em regiões da Ásia e África (HAUSDORFF *et al.*, 2000). No Japão, o sorotipo mais prevalente foi o 19F e responsável por 20% dos pneumococos avaliados (KASAHARA *et al.*, 2005). Na Polônia, os sorotipos mais frequentes são: 14, 19F, 6B e 23F (KONIOR *et al.*, 2009). Na América Latina, 13 principais sorotipos são responsáveis por mais de 85% dos casos invasivos (DI FABIO *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2006; LAVAL *et al.*, 2006). No Brasil, o sorotipo 1 e 14 são alguns dos mais frequentes em infecções pneumocócicas em pacientes adultos e em crianças (BRANDILEONE *et al.*, 2003; CANDIANI, 2004; IAL, 2007), seguidos dos sorotipos 3, 5, 6A, 6B e 18C, 19F e 23F (MANTESE *et al.*, 2003; LOVGREN, *et al.*, 2007; PAHO, 2007). Em Minas Gerais, identificou-se os sorotipos 5, 10A, 6B, 18C, 15B e 6A, sendo o sorotipo 6B o mais envolvido em casos de meningite. Quando presente, a resistência nos sorotipos 6B era somente intermediária (CANDIANI, 2004). O sorotipo 14 é o que mais se apresenta nos pneumococos penicilina resistentes (BRANDILEONE, 2003; CANDIANI, 2004; ROSSONI *et al.*, 2008).

Além da proteção, a vacina pneumocócica reduz a taxa de colonização ou de portadores, diminuindo assim a disseminação da bactéria e induzindo imunidade coletiva (ANVISA, 2010). A introdução da vacina de pneumococo conjugada heptavalente resultou em um declínio dramático nas doenças invasivas causadas pelo *S. pneumoniae* em crianças e um declínio significativo na população não vacinada (WHITNEY *et al.*, 2003, WHITNEY *et al.*, 2006; RAY *et al.*, 2006).

A sorotipagem continuará necessária em pacientes vacinados e não vacinados para avaliar a evolução e o impacto das vacinas multivalentes (WHITNEY *et al.*, 2003; GHAFAR, *et al.*, 2004).

Os primeiros relatos brasileiros de resistência foram descritos por Pires e pesquisadores (1982) e Teixeira e grupo envolvido (1988), em amostras de São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente. Desde então, a resistência do pneumococo, pela grande morbi-mortalidade das suas infecções, vem sendo cada vez mais estudada. Um organismo classificado “resistente” a um agente antimicrobiano pode causar infecção e falha terapêutica quando utilizado o agente antimicrobiano, mesmo nas doses recomendadas. Para a aplicação clínica, a susceptibilidade aos antimicrobianos deve sempre ser interpretada estritamente de acordo com parâmetros padronizados internacionalmente (CDC, 2010). Um painel de considerações específicas para cada droga deve ser analisado a fim de analisar se será ou não a de escolha para o tratamento terapêutico. Algumas considerações merecem ser citadas, como eficácia clínica, prevalência de casos de resistência, custo, indicações do FDA (*Food and Drug Administration*) e opção entre primeira escolha ou droga alternativa (NCCLS, 2003).

Assim como Mthwalo e equipe (1998), foi observado, nesta pesquisa, uma maior resistência no centro urbano em relação ao rural, o que contraria Rossoni (2003) em estudos anteriores no próprio Estado. A justificativa do achado pode ser por um provável acesso e uso de antibióticos na população urbana de forma mais significativa. Além disso, fatores como notificação e controle epidemiológico da Secretaria de Saúde local podem justificar os resultados obtidos na distribuição dos casos de pneumococo isolados em pacientes no Estado do Paraná.

HSUEH e LUTH (2002) afirmam que as taxas de resistência à penicilina variam de acordo com as características da população estudada, como região geográfica e padrão local de uso dos antimicrobianos (SCOTT *et al.*, 2002). Em estudos realizados nos EUA, a porcentagem de resistência aos macrolídeos e penicilina foi de 60% em amostras provindas de pacientes com infecção pneumocócica invasiva (HARBOE *et al.*, 2010). No Brasil, os casos de resistência intermediária à penicilina isolada de doenças invasivas em crianças abaixo de seis anos de idade, variaram de 24,6% em 2000 para 25,4% em 2005. Os níveis de resistência plena variaram de 5,7% para 16,5% no mesmo período (OPS,

2007). A predominância de resistência à penicilina em cepas invasivas de *S. pneumoniae* isoladas em crianças abaixo de dois anos foi confirmada em vários estudos locais ou em âmbito de território nacional. As taxas atingem aproximadamente 15% (BRANDILEONE, 1999; MANTESE *et al.*, 2003; ROSSONI *et al.*, 2008). Neste estudo, houve 39,3% de resistência à penicilina na referida faixa etária.

O método de disco difusão auxilia no direcionamento de indicação ao uso de certos antimicrobianos, como por exemplo o disco de oxacilina (1µg). A oxacilina pode ser utilizada para prever a eficácia do combate ao pneumococo quando *in vivo* por penicilinas e algumas cefalosporinas e carbapenens. Assim, quando o halo de inibição do disco difusão da oxacilina for maior ou igual à 20mm, entende-se que o pneumococo é susceptível a todos esses antimicrobianos citados. Porém, se o halo for inferior à 20mm, é necessário o método de CIM para a classificação entre sensível, intermediário ou resistente às penicilinas e cefalosporinas (CDC, 2010).

A oxacilina é o antimicrobiano de escolha para a confirmação de susceptibilidade do isolado à penicilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxacilina, amoxacilina/ácido clavulânico, cefaclor, cefepima, cefixima, cefotaxima, cefprozil, ceftriaxona, cefuroxima, imipenem e meropenem (DOERN *et al.*, 2005). Dessa forma, nos casos do pneumococo resistente à oxacilina, nenhum desses antimicrobianos terá efetividade plena na terapia empírica do paciente.

Na pesquisa dos genes de resistência aos macrolídeos, a extração do DNA é uma das etapas iniciais e cruciais para que a reação seja de sucesso. Após analisar a revelação do gel, as três técnicas testadas comportaram-se de forma semelhante. As técnicas quente/frio e quente/frio duplo eram as mais vantajosas, por não utilizarem enzimas, diminuindo os custos da pesquisa e o tempo de preparo. Dessas, a técnica quente/frio duplo foi a escolhida para a realização da extração de DNA das amostras de *S. pneumoniae*. A escolha baseou-se nos critérios referidos e por ela necessitar a duplicidade de ciclo, garantindo uma extração mais efetiva.

A confirmação de isolados multirresistentes pode levar dias, se utilizadas técnicas rotineiras (LENTINO *et al.*, 1987; SKERRETT, 1999). O uso da técnica

de PCR para a detecção e quantificação de *S. pneumoniae* tem sido avaliado. Os resultados desses estudos sugerem alta capacidade em diferenciar casos de infecção (APFALTER *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; KAIS *et al.*, 2006; MOROZUMI *et al.*, 2006; BAYRAM *et al.*, 2006).

No presente estudo, a resistência aos macrolídeos foi de 11,2%. De acordo com Mantese e equipe, as taxas foram de 8,3% de resistência em cepas invasivas de *S. pneumoniae* no Brasil. Alguns autores citam que a resistência do pneumococo aos macrolídeos já excedeu à da penicilina (FELMINGHAM *et al.*, 2002; MARCHESE *et al.*, 2005; DOERN *et al.*, 2005; HOBAN *et al.*, 2005). Jenkins e colaboradores (2008), afirmam um aumento de resistência de 9,7% para 18,4%, justificado pela presença dos genes *erm B* e *mef A* nos EUA. O gene *mef A* atingiu 68,8% entre as cepas analisadas, o que contraria este estudo, em que o gene *mef A* foi responsável por apenas 9,1% da resistência aos macrolídeos, *versus* 90,9% por *erm B*. Reinert e colaboradores (2005) avaliaram cepas de oito países da Europa (Áustria, França, Bélgica, Alemanha, Itália, Portugal, Espanha e Suíça) obtendo taxas de 28,0% de resistência. Em estudos comparativos dos isolados para os genes *erm A*, *erm B* e *mef A* e sorotipo mais frequente, apenas 9,1% das cepas de sorotipo 14 apresentou gene de resistência (*erm B*). Hasahara e equipe (2005), em estudos no Japão, atingiram índices de resistência de 89,7% em pneumococo de sorotipo 19F; o mais frequente do referido estudo.

Neste estudo, permanece a susceptibilidade absoluta à vancomicina e ao meropenem em todas as cepas avaliadas, porém houve dois casos de resistência à ceftriaxona, o que era inédito no Estado até o ano de 2003 (ROSSONI, 2003). Em 2003, Mantese e colaboradores afirmam que não houve resistência à vancomicina no Estado de Minas Gerais.

Para analisar a clonalidade dos perfis eletroforéticos, separados pelo PFGE, seguiram-se parâmetros descritos por Tenover (1995).

Os estudos moleculares apontam para a introdução de novos clones como fator interferente na variação dos sorotipos no Brasil (BRANDILEONE, 2007). A virulência e a invasibilidade do pneumococo variam entre os sorotipos e entre cepas de um mesmo sorotipo dependendo da quantidade de polissacarídeo produzido (IAL, 2010)

Estudos epidemiológicos que utilizam técnicas moleculares como o PFGE tem revelado que a propagação de pneumococo resistente aos antimicrobianos é clonal (KASAHARA *et al.*, 2005). Brandileone (2007) enfatiza que há necessidade de se padronizar e validar as técnicas moleculares para o diagnóstico dos sorotipos de pneumococo.

Como a análise do material genético no PFGE é realizada na íntegra, a observação de possíveis eventos genéticos, como a ocorrência de mutações pontuais, deleções ou inserções, tornam a técnica mais eficiente. E, como ocorre a formação de poucas bandas durante a corrida, aproximadamente de 10 a 20 fragmentos, a interpretação dos resultados é facilitada (BENSON, FERRIERI, 2001).

De acordo com Tenover (1995), para analisar a clonalidade dos perfis eletroforéticos, separados pelo PFGE, segue: para haver duas cepas consideradas idênticas, é necessário que o perfil de fragmentação demonstrado no gel seja idêntico. A presença de uma a três bandas diferentes indica que houve um evento genético, alterando o perfil das cepas. Estas pertenceriam ao mesmo complexo clonal, consideradas então, intimamente relacionadas. Quando se observa a diferença de quatro a seis bandas entre os perfis determina-se que houve dois eventos genéticos, tendo a possibilidade das cepas pertencerem ao mesmo complexo clonal, o que as tornariam possivelmente relacionadas. Nos perfis em que há mais de sete bandas diferentes, as cepas são consideradas distantes, pertencentes a complexos clonais diferentes.

A análise de clonalidade das amostras resistentes aos macrolídeos revelou a existência de cepas idênticas, clone A (3670409/1650309) e clone B (500109/13280908) e todos são pertencentes ao sorotipo 6B. Em levantamento epidemiológico, os seguintes dados foram relevantes. As duas cepas do clone A foram isoladas na cidade de Curitiba, no período de março a abril de 2009. As duas cepas do clone B foram isoladas em cidades diferentes, porém com proximidade geográfica e isoladas em um intervalo de quatro meses, o que evidencia um grau de disseminação do agente. A presença dos clones demonstra uma possível relação com o perfil imunológico do paciente, já que todos os clones foram isolados de pacientes menores de 2 anos ou acima de 60.

Ainda na análise clonal dos resistentes aos macrolídeos, interpretou-se a existência de duas cepas possivelmente relacionadas (15811108/16731208). Fato este justificado pela presença de quatro bandas diferentes entre os perfis eletroforéticos. Baseado nos critérios de Tenover (1995), a diversidade genética destes isolados resulta de dois eventos genéticos. Além disso, as cepas são pertencentes a sorotipos diferentes. Os dados epidemiológicos evidenciam os dois isolamentos na cidade de Curitiba, em um intervalo de apenas um mês e provenientes de pacientes com idades de 4 anos e 56 anos. As amostras restantes avaliadas pelo perfil eletroforético de macrorestrição não revelaram proximidade clonal.

Hsieh e colaboradores (2006) obtiveram dez padrões de PFGE diferentes, não relatando a presença de clones durante seu estudo em amostras de sorotipo 6B, o qual era o mais frequente do estudo. A interpretação molecular das cepas do sorotipo 14, o mais prevalente no presente estudo, permitiu a identificação de três clones: clone C (5820907/5830907), clone D (6020408/5240609/9021009) e clone E (451207/1450209). A peculiaridade dos três clones é a procedência das amostras. Todas foram isoladas em cidades diferentes. No caso do clone C, as duas cepas foram notificadas no mesmo mês. O clone D apresenta uma amostra de abril de 2008, uma em junho de 2009 e a terceira em outubro de 2009. Cepas do clone E foram obtidas em época distantes, uma em dezembro de 2007 e a outra em fevereiro de 2009.

Partindo-se do perfil clonal D como base, identificou-se duas cepas intimamente relacionadas, citadas como D1(13581008) e D2 (9210608). A origem das amostras foi na cidade de Ponta Grossa, no período de junho a outubro de 2008. Os eventos genéticos de deleção e inserção justificam a diversidade clonal destas amostras, respectivamente.

Os dados encontrados neste estudo demonstram clones sendo isolados em períodos e regiões distantes, caracterizando o poder disseminatório do patógeno. A realidade da Saúde Pública no estado, aliada aos resultados obtidos, indicam que o pneumococo permanecerá como um dos principais patógenos que acometem a população paranaense. Enfatiza-se assim a importância da notificação e estudo dos casos, comunicação interdisciplinar e atuação efetiva dos

órgãos de saúde envolvidos no sentido de reavaliação de prevenção, controle, retenção e terapêutica em uso.

7 CONCLUSÕES

- Os principais agentes isolados de amostras suspeitas de meningite no Estado do Paraná, no período estudado, foram: *Streptococcus pneumoniae* (38,8%), *Neisseria meningitidis* (36,7%), *Cryptococcus sp* e *Streptococcus sp* (3,2% cada) e *Acinetobacter baumannii* (2,1%).

- Os sorotipos de *S. pneumoniae* encontrados foram: 1 (2%), 3 (3%), 4 (2%), 5 (1%), 6A (4%), 6A/C (4%), 6B (11%), 7F (2%), 8 (1%), 9N (1%), 9V (3%), 12F (5%), 13 (3%), 14 (14%), 15B (3%), 15C (1%), 17F (1%), 18B (1%), 18C (6%), 19A (4 %), 19F (9%), 22F (5%), 23F (4%), 24F (1%), 34 (1%), 35F/47F (1%) e 38 (1%). Amostras não reagente totalizaram 4%.

- A distribuição dos casos de resistência do pneumococo à penicilina em regiões do Estado do Paraná consiste em: mesorregião metropolitana de Curitiba do Estado do Paraná (47,2%), sudoeste (11,2%), oeste (14,1%), centro oriental (8,5%), sudeste (5,6%), norte central (5,6%) e noroeste (2,6%). Para a resistência do pneumococo aos macrolídeos: sudoeste (27,3%), mesorregião metropolitana de Curitiba do Estado do Paraná (45,4%), oeste (18,2%) e sudeste (9,1%).

- Na avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos através da CIM, não foi encontrada resistência à vancomicina nem ao meropenem. Porém, dois casos de resistência à ceftriaxona foram relatados. Aos macrolídeos, o pneumococo mostrou resistência em dez casos (10,2%), pela presença do gene *erm B* e um caso (9,8%), pela presença do gene *erm A*.

- A análise dos perfis eletroforéticos de macrorestrição dos isolados resistentes aos macrolídeos pela técnica de PFGE, descreveu a existência de dois pares de clones idênticos em diferentes regiões do Estado, além de duas amostras possivelmente relacionadas. Nos isolados do sorotipo mais frequente,

identificou-se três perfis clonais, envolvendo sete cepas, e duas cepas intimamente relacionadas.

- Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a necessidade de monitoramento das infecções causadas por *S. pneumoniae*. A prevenção de possíveis surtos e disseminação de resistência poderá ser direcionada pelos estudos epidemiológicos e moleculares das meningites que ocorrem no Estado do Paraná.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, A.; HENRIQUES, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. Tipagem genética de micro-organismos. **Laboratório de Diversidade Microbiana**. Centro de Biologia Celular. Aveiro, 2003.

AMERICAN ACADEMY OF FAMILY PHYSICIANS, AMERICAN ACADEMY OF OTOLARYNGOLOGY-HEAD AND NECK SURGERY, American Academy of Pediatrics subcommittee on otitis media with effusion. **Pediatrics**, 113:1412-29, 2004.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, COMMITTEE OF INFECTIONS DISEASES. Therapy for children with invasive pneumococcal infections. **Pediatrics**, v. 99, n.2, p.289-99, 1997.

ANON, J.B.; *et al.* Antimicrobial treatment guidelines for acute bacterial rhinosinusitis. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 130 (Suppl I): 1-45, 2004.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas. Acesso em 08 de maio de 2010.

APFALTER, P.; STOISE, B.; BAROUSCH, M.; NEHR, M.; KRAMER, L.; BURGMANN, H. Community-acquired bacteria frequency detected by means of quantitative polymerase chain reaction in nosocomial early-onset ventilator associated pneumonia. **Crit Care Med**, 2005. 33:1492-1498.

ARBEIT, R. D.; ARTHUR, M; DUNN, R., KIM, C.; SELANDER, R. K.; GOLDSTEIN, R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. **J. Infect. Dis**, 161:230–235, 1998.

AUSTRIAN, R. Pneumococcus: the first one hundred years. **Rev Infect Dis**, v.3, p.183-9, 1981.

AUSTRIAN, R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. **Ver Infect Dis**, v.3, p.S1-17, 1981(b).

BAYRAM, A.; KOCOGLU, E.; BALCI, I.; FILIZ, A.; EKSI, F. Real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples from patient with community-acquired pneumonia. **J Microb Immunol Infect**, 39:452-457, 2006.

BENSON, J.A.; FERRIER, P. Rapid Pulsed Field Gel Electrophoresis Method for Group B Streptococcus Isolates. **J Clin Microb**, p. 3006-08, 2001.

BEPA, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa20_imuno.htm. Acesso em 01 de março de 2010.

BETRIU, AI. Comparative in vitro activities of linezolid, quinupristin-dalfopristin, moxifloxacin, and trovafloxacin against erythromycin- susceptible and resistant streptococci. **Antimicrob Agents Chemother**, 44:1838-41, 2000.

BLACK, S. SHINEFIELD, H.; FIREMAN, B.; LEWIS, E.; RAY, P.; HANSEN, J.R. ELVIN, L.; ENSOR, K.M.; HACKELL, J.; SIBER, G.; MALINOSKI, F.; MADORE, D.; CHANG, I.; KOHBERGER, R.; WATSON, W.; AUSTRIAN, R.; EDWARDS, K.; THE NORTHRN CALIFORNIA KAISER PERMANENT VACCINE STUDY GROUP. Eficácia, segurança e imunogenicidade da vacina pneumocócica conjugadas heptavalente em crianças. **Pediatr Infect Dis J**, v. 19, n.3, p.4-12, 2000.

BOLMSTROM, A.; ARVIDSON, S.; ERICSSON, M.; KARLSSON, A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of

microorganisms. In: ICAAC, Los Angeles, 23-26, **Poster Session**, poster 101, 1998.

BRANDÃO, A.P.; OLIVEIRA, T.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; GONÇALVES, J.E.; YARA, T.I.; SIMONSEN, V. Persistence of antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides in vaccinated long term-care residents in Brazil. **Vaccine**, 23:762-768, 2004.

BRANDILEONE, M. C. C. **SIREVA no Brasil: funcionamento e apresentação de dados**, São Paulo, 2007.

BRANDILEONE, M.C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Brazilian children with invasive infections. **Microb Drug Resist**, 7:141-146, 1997.

BRANDILEONE, M.C.; CASAGRANDE, S.T.; GUERRA, M.L.; ZANELLA, R.C.; ANDRADE, A.L.; DI FABIO, J.L. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J Med Microbiol**, 55:567-574, 2006.

BRANDILEONE, M.C.C. **Distribuição de sorotipos, resistência antimicrobiana e perfil molecular de *Streptococcus pneumoniae* isolado de doença invasiva no Brasil: 1993 a 1998**. São Paulo, 1999. 207f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

BRANDILEONE, M.C.C.; ANDRADE, A.L.S.; DI FABIO, J.L.; GUERRA, M.L.L.S.; AUSTRIAN, R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J Infec Dis**, 187, 1206-1212, 2003.

BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; CASAGRANDE, S.T. et al. Characteristics of isolates *Streptococcus pneumoniae* from middle aged and

elderly adults in Brazil: capsular serotypes and antimicrobial sensitivity with invasive infections. **Braz J Infect Dis**, 2:90–6, 1998.

BRITO, D. A.; RAMIREZ, M.; DE LENCASTRE, H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. **J Clin Microbiol**; 41, 2378–2384, 2003.

CAMILLI, R. GROSSO, M.D., IANNELLI, F., P, A. New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*, **Antimicrob Agents and Chemother**, p.619-25, 2008.

CANDIANI, Talitah M.S, et al., Perfil de sensibilidade em infecções pneumocócicas e análise de conduta terapêutica em hospital de referência em doenças infecciosas. **Rev Med Minas Gerais**, 14(2): 100-6, 2004.

CARLE, G. F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, 232:65–68, 1986.

CDC. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Report *Streptococcus pneumoniae*, 2004. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention. Disponível em <http://www.cdc.gov/incidod/dbmd/abcs/survreports/spneu04.pdf>, 2005.

CDC. Center for disease control and prevention. Disponível em www.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/pneumococcal-disease.aspx. Acesso em 18 de março de 2010.

CDC. Center for disease control and prevention. Disponível em: www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/pneumo/in-short-both.htm.who. Acesso em 19 de março de 2010.

CDC. Center of Disease controlling laboratory methods. Disponível em: www.cdc.gov . Acesso em 10 de março de 2010.

CDC. National Ambulatory medical Care Survey (NAMCS). Hyattsville, m.d.: US Department of Health and Human Services. **Center for Disease Control and Prevention**, 2003.

CDC. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR**. 49:1-35, 2000.

CDC. Prevention of pneumococcal disease. **MMWR**; 46:1-20, 1997.

CHU, G.; VOLLRATH, D. DAVIS, R.W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. **Science**, 234:1582–1585, 1986.

CLSI – **Clinical and Laboratory Standard Institute**. Performance standards for antimicrobial Disk susceptibility tests; Approved Standart – Tenth edition, 2009.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth Informational Supplement. **CLSI** document M100-S18. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standard Institute**, January 2008.

CORCOLES, A.; OCHOA, O.; GUZMAN, J.A.; BLANCO, R.; SALSENC, E.; FUENTES, C.M. EPIVAC, S.G. Effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine against invasive pneumococcal disease in people 60 years or older. **BMC Infec Dis**, 10(1):73, 2010.

D OLIVEIRA, R. Antimicrobial Susceptibility and Survey of Macrolide Resistance Mechanisms among *Streptococcus pyogenes* Isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist**, 9(1): 87-91, 2003.

DAGAN, R. Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. **Pediatr Infect Dis J**, 22, 532-539, 2003.

DAVIES, E.P. Predominance of 23S rRNA mutants among non-Erm, non-Mef macrolide resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999-2000. **Antimicrob Agents Chemother**, 49:3031-33, 2005.

DESJARDINS M. Prevalence and Mechanisms of Erythromycin Resistance in Group A and Group B *Streptococcus*: Implications for Reporting Susceptibility Results. **J Clin Microbiol**, 42(12): 5620-23, 2004.

DESSEN, A.; MOUZ, N.; GORDON, E.; HOPKINS, J.; DIDEBERG, O. Crystal Structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate. **Journal of Biological Chemistry**, v.276: 45106-112, 2001.

DI FABIO, J. L.; CASTANEDA, E.; AGUDELO, C. I.; DE LA HOZ, F.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ECHANIZ-AVILÉ S, G.; NOEMI, M., BARAJAS, C. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. The PAHO Sireva-Vigia Study Group. **Pediatr Infect Dis J**, 20:959–967, 2001.

DOBAY, O., ROZGONYI, F. AMYES, G.B. Molecular characterization of Hungarian macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates, including three highly resistant strains with *mef* gene. **Int J Antimicrob Agents**, 25:488-95, 2005.

DOERN, G.V. RITCHER, S.S.; MILLER, A.; MILLER, N.; RICE, C.; HEILMANN, K.; BEEKMANN, S. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? **Clin Infect Dis**, 41:139-148, 2005.

DUARTE, R.S.; BARROS, R.R.; FACKLAM, R.R.; TEIXEIRA, L.M. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group B *Streptococci* recovered from bovine and human sources. **Antimicrob Agents Chemot**, 49(1):97-103, 2005.

EMERGING INFECTIOUS DISEASES. Clindamycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Disponível em www.cdc.gov/eid. Acesso em: 25 mar. 10.

FARREL D.J; MORRISSEY, R.; BAKKER, S.; MORRIS, L.; FELMINGHAM, D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm* (B) and *mef* (A) mediated macrolide resistance. **J Clin Microbiol**, 42: 764-768, 2004.

FELMINGHAM, D. *et al.* Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the surveillance study (2000-2002). **Int J Antimicrob Agents**, 50:25-37, 2002.

FIOCRUZ, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Disponível em [HTTP://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=3138&sid=9](http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=3138&sid=9). Acessado em 28 de fevereiro de 2010.

GARCIA, S., LEVINE, O. S., CHERIAN, T., GABASTOU, J. M., ANDRUS, J. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. **Rev Panam Salud Publica**, 19:340–48, 2006.

GHAFFAR, F.; BARTON, T.; LOZANO, J.; MUNIZ, L. S.; HICKS, P.; GAN, V.; AHMAD, N.; MCCRAKEN, G. H. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. **Clin Infect Dis**, 39, 930–938, 2004.

GONZÁLEZ-REY, C.; BELIN, A.M.; JÖRBECK, H.; NORMAN, M.; KROVACEK, K.; HENRIQUES, B.; KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S.B.; RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Diseases**, v.26, p.25-35, 2003.

HAKENBECK R; TARPAY, M, TOMASZ, A. Multiple changes of penicillin binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *S. pneumoniae*. **Antimicrob**

Agents Chemother, 17:264-71, 1980.

HARBOE, Z.B.; BENFIELD, T.L.; VALENTINER-BRANTH, P.; HJULER, T.; LAMBERSTEN, L.; KALTOFT, M.; KROGFELT, K.; SLOTVED, H.C.; CHRISTENSEN, J.J.; KOURADSEN, H.B. Temporal trends in invasive pneumococcal disease and pneumococcal serotypes over 7 decades. **Clin Infect Dis**, 1:50(3):329-37, 2010.

HAUSDORFF, W.P.; BRYANT, J. PARADISO, P.R.; SIBER, G.R. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis**, 30:100-121, 2000.

HO, P. L.; WONG, R. C. W.; CHOW, F. K. H.; CHEUNG, M. Y. M. WONG, W. C. QUE, T. L. Application of multiplex *pbp2b* and *pbp2x* PCR for prediction of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, 53: 890-891, 2004.

HOBAN, D. BAQUERO, F., REED, V. FELMINGHAM, D. Demographic analysis of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae*: worldwide results from PROTEKT 1999-2000. **J Infect Dis**, 2005

HOBERMAN, A.; MARCHANT, C.D.; KAPLAN, S.L.; FELDMAN, S. Treatment of acute otitis media consensus recommendations. **Clin Pediatr**, 41: 373-390, 2002.

HSIEH, Y.C.; WANG, J.T.; LEE, W.S.; HSUEH, P.R.; SHAO, P.L.; CHANG, L.Y.; LU, C.Y. LEE, C.Y.; HUANG, F.Y.; HUANG, L.M. Serotype Competent and Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Emerg Infect Dis**, v.12. n.11. p.1709-14, 2006.

HSUEH, P.R.; LUTH, K.T. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, Taiwan. **Emerg Infect Dis**, 8:1487-1491, 2002.

HUSAI, E.; CHAWLA, R.; DOBSON, S.; DELE DAVIS, H. Epidemiology and

outcome of bacterial meningitis in Canadian children: 1998-1999. **Clin Invest Med**, 29(3):131-5, 2006.

IAL, Instituto Adolf Lutz. **Apêndice 11. Bacteriologia de *S. pneumoniae***. Instituto Adolf Lutz, São Paulo, 2010.

JALAL, H. S. ORGANJI, J.; REYONLDS, J.; BENNETT, D.; O'MASON, J. MILLAR, M. R. Determination of penicillin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* using the polymerase chain reaction. **Mol Pathol**, 50:45-50, 1997.

JENKINS, S.G.; BROWN, S.D.; FARREL, D.J. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: uptade from PROTEKT US Years 1-4. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2008.

KAIS, M.; SPINDLER, C.; KAIN, M.; ORTQVIST, A.; GISKE, C. G. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. **Diag Microbiol Infect Dis**, 55:169-178, 2006.

KAPLAN, S.L.; MASON, J.R. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7- valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatrics**, 113:443-449, 2004.

KAPLAN, S.L.; MASON, J.R. Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Clin Microb Rev**, v.11, p. 628-44, 1998.

KASAHARA, K.; MAEDA, K.; MIKASA, K.; UNO, K.; TAKAHASHI, K.; KONISHI, M.; YOSHIMOTO, E.; MURAKAWA, K.; KITA, E.; KIMURA, H. Clonal dissemination of macrolide-resistant and penicillin-susceptible serotype 3 and penicillin-resitant Taiwan 19F and 23F-15 *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan: a pilot surveillance study. **J Clin Microb**, v.43, n. 4, p.1640-45, 2005.

KELLOGG, J.A.; BANKERT, D.A.; ELDER, C.E.; GIBBS, J.L.; SMITH, M.C.

Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. **J Clin Microbiol**, v.39, p.3373-5, 2001.

KERNODLE, D.S. In Gram-positive pathogens. **American society for Microbiology**, Washington, D. C. pp. 609-620, 2000.

KONIOR, R.; SKOCZVISKA, A.; BOJARSKA, K.; KADUBOWSKI, M.; HRYNIEWICZ, W. Invasive pneumococcal disease in the Malopolska region of Poland in the year 2002-2008 is introduction of mass vaccination with conjugated pneumococcal vaccine justified? **Med Wluku Rozwoi**, 13(4):317-23, 2009.

LAVAL, C.B.; DE ANDRADE, A.L.; PIMENTA, F.C.; DE ANDRADE, J.G.; DE OLIVEIRA, R.M.; SIILVA, S.A.; DE LIMA, E.C.; FABIO, J.L.; CASAGRANDE, S.T.; BRANDILEONE, M.C. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin Microbiol Infect**; 12, 50-55, 2006.

LECLERCQ, R. COURVALIN, P. Mechanisms of resistance to macrolides and functionally related antibiotics, **Antimicrob Agents Chemother**, p. 125-141, 1993.

LECLERCW, R. COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrob Agents Chemother**, 35: 1273-1276, 1991.

LEE, R., PEPPE, J.; GEORGE. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic digests demonstrates linkages among food, food handlers, and patrons in a food-borne *Salmonella javiana* outbreak in Massachusetts. **J. Clin. Microbiol**, 36:284–285. 1998

LENTINO, J. R.; LUCKS, D. A. Nonvalue of sputum culture in the management of lower respiratory tract infectinos. **J Clin Microbiol**, 25:758-762, 1987.

LEPUR, D.; BASIC, B.; Community-acquired bacterial meningitis in adults: antibiotic timing in disease course and outcome. **Infection**, 35:225-231, 2007.

LIPSITCH, M. Interpreting results from trials of pneumococcal conjugate vaccines: a statistical test for detecting vaccine-induced increases in carriage of nonvaccine serotypes. **Am J Epidemiol**, 154:85-92, 2001.

LOVGREN, M.; TALBOT, J.A.; BRANDILEONE, M.C. *et al.* Evolution of an international external quality assurance model to support laboratory investigation of *Streptococcus pneumoniae*, developed for the SIREVA project in Latin America, from 1993 to 2005. **J Clin Microbiol**, 45:3184-3190, 2007.

LUND, E.; HENRYCHSEN, J. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: ERGAN, T.; NORRIS, J.R. **Meth Microbiology**, London: Academic Press, p. 242-62, 1978.

MAGALHÃES, A.P.G.O. **Sensibilidade aos antimicrobianos e sorotipagem de isolados do *S. pneumoniae***, no Centro Geral de Pediatria, Belo Horizonte, MG, Brasil (tese de doutorado). BH, UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, 2001.

MANDELL, L.A.; BARTLETT, J.G.; DOWELL, S. F.; FILE, T. M.; WHITNEY, C. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. **Clin Infect Dis**, 37:1405-33, 2003.

MANTESE, O. C. Pneumococo resistente à penicilina: implicações práticas. **J Pediatr**, 1:74-90, 1999.

MANTESE, O.C.; PAULA, A.; MORAES, A.B.; MOREIRA, T.A.; GUERRA, M.L.L.S; BRANDILEONE, M.C.C.; Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae*. **J Ped**, 79(6) 537:42, 2003.

MAPA DEMOGRÁFICO DO PARANÁ. Disponível em: http://www.o-parana.com/diretorio/index.php?cat_id=911&cat_id_thm=29. Acesso em 07 de

maio de 2010.

MARCHESE A. SCHITO, G.C.; FADDA, G.; NICOLETTI, G. Antibiotic susceptibility and serotype distribution in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the surveillance study (2000-2002). **Int J Antimicrob Agents**, 26:138-145, 2005.

MENAKER, J.; MARTIN, I.B.; HIRSHON, J.M. Markedd elevation of cerebrospinal flui white blood cell count: an unusual case of *Streptococcus pneumoniae* meningitis, differential diagnosis, and a brief review of current epidemiology and treatment recommendations. **J Emerg Med**, 29(1):37-41, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vacinacontrapeumococcus7/valente.pdf>. Acesso em 28 de fevereiro de 2010.

MONACO, M., et al. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. **J Antimicrob Chemother**, 55: 256-9, 2005.

MONTANER, M.; MONERO, R.; GIL, M.; ROMÁN, J.; GOBERNADO, M.; CANTÓN, E. Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* serotypes before vaccination. **Clin Microbiol and Infect**, v.7, n.1, p.173, 2001.

MORONA, J.K.; MORONA, R.; PATON, J.C. Analysis of the 5'portion of the type 19A capsule locus identifiocs two classes of *cpsC*, *cpsD* e *cpsE* genes in *Streptococcus pneumoniae*. **J Bacteriol**, 181:3599-3605, 1999.

MOROZUMI, M.; NAKAYAMA, E.; IWATA, Y. S.; HASEGAWA, K. KOBAYASHI, R.; CHIBA, R.; UBUKATA, K. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. **J Clin Microbiol**, 44:1440-1446, 2006.

MTHWALO, M.; WASAS, A.; HUEBNER, R.; KORNHOF, H.J.; KLUGMAN, K.P. Antibiotic resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from children in Lesotho. **Bull World Health Organ**, v.76, p. 641-50, 1998.

MUNOZ, R; MUSSER, J.M; CRAIN, M, et al. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. **Clin Infect Dis**, 15:112-8, 1992.

MURPHY, E., HUWYLER, L., BASTOS, M. C. F. Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. **EMBO J**, 4:3357-65, 1985.

MUSHER, D.M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. **Clin Infect Dis**, v.14. p.801-9, 1992.

MUSHER, M.D.; GROOVER, J.E.; ROWLAND, J.M.; WATSON, D.A.; STRUEWING, J.B.; BAUGHN, R.E.; MUFSON, M.A. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, persistence, and response to revaccination. **J Stor**, 1993.

NAGAI, K.; SHIBASAKI, Y.; HASEGAWA, K. DAVIS, T. A. JACOBS, M. R. UBUKATA, K. APPELBAUM, P. C. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and β -lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. **J Antimicrob Chemother**, 48:915-918, 2001.

NAZIANZENO, A.V.; NÓBREGA, L.I.; JUNIOR, R.R.T. Importância da vacina antipneumocócica na faixa etária pediátrica. **UFPB-PRG**, 2007.

NCCLS, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational

supplement, 2003.

NIEDERMAN, M. S.; MANDELL, L.A.; ANZUETO, J. B. BROUGHTON, W. A.; CAMPBELL, G. DEAN, N.; FILE, T.; GROSS, P. A.; MARTINEZ, F.; MARRIE, T. J. SAROSI, G. A. TORRES, A. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. **Am J Respir Care Med**, 163:1730-1754, 2001.

OBARO, S.K. The new pneumococcal vaccine. **Clin Microbiol Infect**, v.8, n.10, p.623-33, 2002.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, USA, v.37, n.6, p.1661-69, 1999.

OPS, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Informe regional de SIREVA: II. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores, 2000-2005. Washington, 2007.

PAHO, Organização Panamericana de Saúde. **XXIV Conferência Sanitária Panamericana - XLVI Reunion del Comité Regional**, Washington, 2007.

PAI, R.; GERTZ; R. E.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J Clin Microbiol**, 44, 124–131, 2006.

PAN-American Health Organization. Informe Regional de SIREVA II: **Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores, 2000-2005**, OPS, Documentos Técnicos, Tecnologías Esenciales de Salud. Washington, DC; 2007. Disponível em: www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/LABS-Sireva.pdf. Acesso em 12 de fevereiro de 2010.

PARADISI, F.; CORTI, G.; CINELLI, R. *Streptococcus pneumoniae* as an agent of nosocomial infection: treatment in the era of penicillin-resistant strains. **Clin Microbiol Infect**, v.7, n.4, p.34-42, 2001.

PARANÁ, SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE; CENTRO DE INFORMAÇÃO E DIAGNÓSTICO EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DOENÇAS IMUNOPREVENÍVEIS. **Sistema de informações de agravos de notificação**, Paraná, 2000.

PCR, reação em cadeia pela polimerase. Disponível em http://educacao.genesisdbm.com.br/educacao_pcr.shtml. Acesso em: 25 de março de 2010.

PCR, técnica de biologia molecular: Disponível em: www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-debiologiamolecularpcrreacaoemcadeiadapolimerase. Acesso em 25 de março de 2010.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. TAUNAY, A.E. Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contra-imunoelektroforese. **Ver Inst Adolfo Lutz**, v.42, p.1-8, 1982.

PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/104/35/14098/F1.expansion.html>. Acesso em 08 de maio de 2010.

RADSTROM P, BACKMAN A, QIAN N, KRAGSBJERG P, PAHLSON C, OLCEN P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a semi nested PCR strategy. **J Clin Microbiol**, 32 : 2738-44, 1994.

RAJKHAN, W.A.; TAHIR, O.; GASIM, A.; HAMZA, N. Fulminant pneumococcal meningitis manifesting as acute abdomen. **British Journal of Hospital**

Medicine, 71(2):110-111, 2010.

RAY, G. T.; WHITNEY, C. G.; FIREMAN, B. H.; CIURYLA, V.; BLACK S. B. Cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine: evidence from the first 5 years of use in the United States incorporating herd effects. **Pediatr Infect Dis**, J 25, 94–501, 2006.

REINERT, R.R.; REINER, S.; LINDEN, M.; CIL, M.; LAHLAM, A.; APPELBAUM, P. Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Eight European Countries from 2001 to 2003. **Antimicrob Agents and Chemother**, v.49, n.7, p. 2903-13, 2005.

REYES, M.; TORRES, J. P.; PRADO, V.; VIDAL, R. Multiplex PCR assay in spinal fluid to identify simultaneously bacterial pathogens associated to acute bacterial meningitis in Chilean children. **Rev Med Chile**, 136: 338-346, 2008.

ROBBINS, J.B. Consideration for formulating the second generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross reactive types within groups. *J. Infect. Dis.* 148: 1136-1158, 1983.

ROBINSON, K.A. BAUGHMAN, W.; ROTHROCK, G.; BARRETT, N.L.; PASS, M. LEXAU, C. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. **JAMMA**, 285:1729-35, 2001.

ROSSONI, A. M. O.; COSTA, L. M. D.; BERTO, D. B.; FARAH, S. S.; GELAIN, M.; BRANDILEONE, M. C. C.; RAMOS, V. H. M.; ALMEIDA, S. M. Acute bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* resistant to the antimicrobial agents and their serotypes. **Arq. Neuropsiquiatr**, 66:509-515, 2008.

ROSSONI, A.M.O. **Resistência aos antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae* isolado de pacientes com meningite bacteriana agudo no Estado do Paraná**, no período de abril de 2001 a agosto de 2002, Curitiba,

2003. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.

RZESZUTEK, M.; WIERZBOWSKI, A.; HOBAN, D.J.; CONLY, J.; BISHAI, W.; ZHANEL, G.G. A review of clinical failures associated with macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Agents**, 24:95-104, 2004.

SAHM, D. F. JONES, M. E. ; HICKEY, M. L.; DIAKUN, D. R.; THORNSBERRY, C. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. **J Antimicrob Chemother**, 45:457-466, 2000.

SCHUT, E. S.; J. DE GANS, D. VAN DE BEEK. Community-acquired bacterial meningitis in adults. **Pract Neurol**, 8:8-23, 2008.

SCHUURMAN, T.; R. F. DE BOER; KOOISTRA-SMID, A. M.; A. VAN ZWET. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. **J Clin Microbiol**, 42:734-740, 2004.

SCOTT , J.A.G.; HALL, A.J.; HANNINGTON, A.; EDWARDS, R.; MWARUMBA, S.; LOWE, B.; GRIFFITHS, D.; CROOK, D.; MARSH, K. Serotypes distribution and prevalence of resistance to benzyl penicillin in the three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. **Clin Infect Dis**, v. 27, p. 1442-50, 2002.

SCRAG, S. J. MC GREE, L.; WHITNEY, C.G.; BEALL, B.; CRAIG, A.S.; CHOATE, M.E.; JORGENSEN, J.H.; FACKLAM, R.R.; KLUGMAN, K.P. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* with very-high-level resistance of penicillin. **Antimicrob Agents Chemother**, 48, 3016-3023, 2004.

SHUCHAT, A.; TOBINSON, K.; WENGER, J.D.; HARRISON, L.H. FARLEY, M.; REINGOLD, A.L. Bacterial meningitis in the United States in 1995. **N Engl J Med**,

337:970-6, 1997.

SIMONSEN, V. BRANDÃO, A.P.; BRANDILEONE, M.C.; YARA TI,; Di Fabio J.LL; LOPES, M.H.; JACOB FILHO, W. Immunogenicity of a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Brazilian elderly. **Braz J Med Biol Res**, 38:251-260, 2004.

SKERRETT, S. J. Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. **Clin Chest Med**, 20:531-548, 1999.

SORIANO, F.; CAFINI, F.; AGUILAR, L.; TARRAGÓ, D.; ALOU, L.; GIMÉNEZ, M.J.; GRACIA, M.; PONTE M.C.; LEU, D.; PANA, M.; LETOWSKA, I. FENOLL, A. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. **J Antimicrob Chemother**, 62: 1234-40, 2008.

SPIKA, J.S.; FACKLAM, R.R.; PLIKAYTIS, B.D.; OXTOBY, M.J. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1979-1987. The pneumococcal surveillance working group. **J Infect Dis**, 163: 1273-1278, 1991.

SPIKA, J.S.; FEDSON, D.S.; FACKLAM, R.R. Vacinação antipneumocócica: controvérsia e oportunidades. In: SCHAFFNER, W. **Clínicas de Doenças Infecciosas da América do Norte**, Rio de Janeiro: Interlivros, p 11-26, 1990.

SUNAKAWA, K.; SAKAI, F.; HIRAO, Y.; HANAKI, H.; NONOYAMA, M.; IWATA, S.; AKITA, H.; SATO, Y. Childhood bacterial meningitis trends in Japan from 2007 to 2008. **Kansenshogaku Zasshi**, 84(1)33-41, 2010.

SUTCLIFFE, J. KAMRADT, A.T; WONDRACK, L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. **Antimicrob Agents and Chemother**, p.1817-1824.

SWENSON, J. HILL, B.C.; THORNSBERRY, C. Screening pneumococci for penicillin resistance. **J Clin Microbiol**: v.24, p. 749-52, 1986.

SYROGIANNOPOULOS, G.A. Identification of an *erm(A)* erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. **Antimicrob Agents Chemother**, 45: 342-44, 2001.

TANG, Y. W.; LI, H.; GRIFFIN, J. P.; HAAS, D. W.; D'AGATA, E. M. Rapidly increasing prevalence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in middle Tennessee: a 10-year clinical and molecular analysis. **J Clin Microbiol**, 40: 395-399, 2002.

TENOVER, FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Muray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, 33(9): 2233–9, 1995.

TEIXEIRA, L.M.; ANDRADE, JR.; LOURENÇO, N.J. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Ver Microbiol**, v.19, p. 93-9, 1988.

THIGPEN, M.C. ROSENSTEIN, N.E. WHITNEY, C.G. LYNFIELD, R. FARLEY, M. CRAIG, A.S. Bacterial meningitis in the United States – 1998-2003. Presented at the **Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America**, Boston. M.A. 2005.

TOMAZ, A. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. New York: **Mary Ann Liebert**, 2000.

UBUKATA, K.; ASAH, Y.; YAMANE, A.; KONNO, M. Combinational detection of autolysin and penicillin-binding protein 2B genes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR. **J Clin Microbiol**, 34:592-596, 1996.

UBUKATA, K.; MURAKI, T.; IGARASHI, A.; ASAH, Y.; KONNO, M.; Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. **J Infect Chemother**, 3:190-197, 1997.

UNIPP. Hospital Pequeno Príncipe – Neuropediatria. Disponível em: <http://www.neuropediatria.org.br>. Acessado em 10 de junho de 2010.

VAN ELDERE, J., *et al.* Macrolide-resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Belgium. **Clin Microbiol Infect**, 11: 332-34, 2005.

VEENHOVEN, R.; BOGAERT, D.; UITERWAAL, C.; BROUWER, H. KIEZEBRIN, J. IJZERMAN, E.; HERMANS, P.; GROOT, R.; KUIS, W.; SANDERS, E. Effect of conjugate pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent otitis media: a randomized study. **Lancet**; 361:2189-2195, 2003.

VENGLARCIK, J.S. *S. pneumoniae* antimicrobial susceptibility testing. **Pediatr Infect Dis J**, 19:329-30, 2000.

VPD. Pneumococcal Disease. **Surveillance Manual**, 4th Edition. Chapter 11-1, 2008.

WEISFELT, M.; BEEK, D.; SPANJAARD, L.; REITSMA, J.; GANS, J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. **Lancet Neurol**, 5:123-129, 2006.

WELINDER-OLSSON, C.; DOTEVALL, L.; HOGÉVIK, H.; JUNGNELIUS, R.; TROLLFORS, B. LARSSON, P. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. **Clin Microbiol Infect**, 13:879-886, 2007.

WHITNEY, C. G.; FARLEY, M. M.; HADLER, J.; HARRISON, L. H.; BENNETT, N. M.; LYNFIELD, R.; REINGOLD, A.; CIESLAK, P. R.; PILISHVILI, T. Decline in

invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs)/Emerging Infections Program Network. **N Engl J Med**; 348, 1737–1746, 2003.

WHITNEY, C. G.; PILISHIVILI, T.; FARLEY, M. M.; SCHAFFNER, W.; CRAIG, A. S.; LYNFIELD, R.; NYQUIST, A. C.; GERSHMAN, K. A.; VAZQUEZ, M. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case control study. **Lancet**; 368, 1495–1502, 2006.

YAN, J.J.; LIU, C.C.; KO, W.C.; HSU, S.Y.; WU, H.M.; LIN, Y.S.; CHUANG, W.J. Molecular analysis of group A streptococcal isolates associated with scarlet fever in southern Taiwan between 1993 and 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 4858-4861, 2003.

YANG, S.; LIN, S.; KHALIL, A.; GAYDOS, C.; NUEMBERGER, E.; JUAN, G.; HARDICK, J.; ROTHMAN, R. E. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults emergency department patients. **J Clin Microbiol**, 43:3221-3326, 2005.

ANEXO 1 – IDENTIFICAÇÃO, DADOS DEMOGRÁFICOS E SOROTIPOS

AMOSTRA	CÓDIGO	REGIONAL	CIDADE	IDADE	SEXO	CULTURA	SOROLOGIA	SOROTIPO
1	1550507	2	S.J.P.	58a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	22F
2	2000607	3	Ponta Grossa	13a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	13
3	2070607	3	Ponta Grossa	5m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19 ^a
4	2120607	2	Curitiba	6a	M	<i>S. pneumoniae</i>	NR	19F
5	2290607	12	Umuarama	36a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	34
6	4410707	17	Londrina	22a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	3
7	4580707	3	Ponta Grossa	3m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	23F
8	4680807	2	Curitiba	30a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
9	5200807	11	Campo Mourão	22a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
10	5230807	19	Jacarezinho	25a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	9V
11	5430807	21	Telêmaco Borba	67a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	13
12	5820907	6	União da Vitória	37a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
13	5830907	14	Paranavaí	5a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
14	5950907	3	Ponta Grossa	33a	M	<i>S. pneumoniae</i>	NR	NR
15	6120907	5	Guarapuava	10a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	NR
16	6170907	16	Apucarana	48a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	38
17	6250907	15	Maringá	5m	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6 ^a
18	6410907	2	Curitiba	53a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	9N
19	7171007	17	Londrina	36a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	1
20	7371007	17	Londrina	13a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	7F
21	8011007	2	Curitiba	5m	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
22	8521007	4	Imbituva	25a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	15B
23	451207	6	União da Vitória	1a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
24	551207	2	Curitiba	11a	F	<i>S. pneumoniae</i>	NR	17F
25	2200108	2	Curitiba	10m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
26	2320108	2	Curitiba	59a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19 ^a
27	2960208	3	Ponta Grossa	11a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	15B
28	4110308	19	Jacarezinho	4a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6A/C
29	4260308	2	Curitiba	22a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
30	4610408	2	Campo Largo	56a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6 ^a
31	4630408	6	União da Vitória	36a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18B
32	4650408	10	Cascavel	59a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
33	5160408	3	Ponta Grossa	33a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	22F
34	6020408	16	Apucarana	10m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
35	7340508	8	Francisco Beltrão	20a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	24F
36	7450508	2	Curitiba	13a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	9V
37	7950608	1	Paranaguá	4m	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	9V
38	8030608	6	União da Vitória	46a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	12F
39	8070608	8	Francisco Beltrão	5a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	4

AMOSTRA	CÓDIGO	REGIONAL	CIDADE	IDADE	SEXO	CULTURA	SOROLOGIA	SOROTIPO
40	8120608	2	Curitiba	4m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19 ^a
41	8130608	2	Curitiba	12a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	NR
42	8500608	2	Curitiba	73a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
43	8560608	2	Curitiba	58a	F	<i>S. pneumoniae</i>	NR	12F
44	8700608	19	Jacarezinho	3a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18C
45	9210608	3	Ponta Grossa		M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
46	9680708	2	Curitiba	29a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	12F
47	9820708	2	Curitiba	1a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6A/C
48	9880708	20	Toledo	16a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
49	10190708	2	Curitiba	5m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	12F
50	10370708	2	Curitiba	72a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	1
51	10650708	10	Cascavel	13a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6A/C
52	11150808	8	Francisco Beltrão	24a	F	<i>S. pneumoniae</i>	NR	23F
53	11600808	2	Curitiba	26a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6A/C
54	12040908	8	Francisco Beltrão	61a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19 ^a
55	12680908	2	Curitiba	7m	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18C
56	12810908	8	Francisco Beltrão	56a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	23F
57	13280908	9	Foz do Iguaçu	6m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
58	13581008	3	Ponta Grossa	7m	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
59	14891008	20	Toledo	16a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	3
60	14961108	2	Curitiba	6a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	3
61	15811108	2	Curitiba	4a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
62	16121108	4	Irati	36a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
63	16731208	2	Curitiba	56a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
64	17421208	16	Apucarana	39a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	7F
65	17721208	2	Curitiba	50a	F	<i>S. pneumoniae</i>	NR	14
66	17761208	1	Paranaguá	1a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
67	17821208	21	Telêmaco Borba	11m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	12F
68	500109	10	Cascavel	7m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
69	820209	4	Irati	26a	M	<i>S. pneumoniae</i>	NR	8
70	860209	13	Cianorte	9a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
71	1450209	2	Curitiba	7m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
72	1650309	2	Curitiba	1a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
73	1880309	9	Foz do Iguaçu	23a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
74	2200309	1	Paranaguá	40a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
75	2440309	2	Curitiba	5m	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	NR
76	3180409	2	Curitiba	54a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	23F
77	3240409	2	Curitiba	8m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18C
78	3670409	2	Curitiba	62a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
79	3840509	16	Apucarana	79a	M	<i>S. pneumoniae</i>	NR	22F

AMOSTRA	CÓDIGO	REGIONAL	CIDADE	IDADE	SEXO	CULTURA	SOROLOGIA	SOROTIPO
80	3870509	15	Maringá	1a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
81	4130509	10	Cascavel	9a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	13
82	4780609	2	Curitiba	2a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18C
83	4990609	2	Curitiba	6a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18C
84	5240609	2	Curitiba	4a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
85	5280609	7	Pato Branco	68a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6B
86	5290609	8	Francisco Beltrão	43a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	18C
87	5670709	11	Campo Mourão	2m	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	35F/47F
88	5880709	16	Arapongas	55a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	15C
89	5910709	21	Telêmaco Borba	1a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	4
90	6020709	9	Foz do Iguaçu	3a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	19F
91	6670709	12	Umuarama	1a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	22F
92	6870809	13	Cianorte	1a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6 ^a
93	6930809	2	Curitiba	56a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	6 ^a
94	7000809	2	Curitiba	30a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	15B
95	7610909	2	Curitiba	36a	M	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14
96	7960909	20	Toledo	3a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	22F
97	8291009	2	Curitiba	41a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	5
98	9021009	5	Guarapuava	5a	F	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	14

ANEXO 2 – TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

AMOSTRA	CÓDIGO	PG E-test	TX E-test	VA E-teste	MP E-test	ERI E-test	CLI E-test	CIP E-test	ERI disco	CLI disco	D-Test	OXA	PERFIL
1	1550507	0,047	0,032	0,380	0,012	0,032	0,047	0,750	30	26	N	> 20	S
2	2000607	0,125	0,190	0,250	0,008	0,064	0,064	1,500	28	24	N	> 20	S
3	2070607	0,094	0,047	0,380	0,016	0,094	0,032	1,000	31	25	N	> 20	S
4	2120607	0,094	0,094	0,380	0,023	0,094	0,125	1,000	29	25	N	18	R
5	2290607	0,023	0,064	0,250	0,006	0,032	0,047	0,750	31	27	N	>20	S
6	4410707	0,016	0,016	0,250	0,008	0,094	0,032	0,750	34	31	N	>20	S
7	4580707	0,190	0,094	0,250	0,032	0,094	0,125	1,000	29	23	N	16	R
8	4680807	0,012	0,023	0,500	0,016	0,190	0,190	1,000	29	25	N	> 20	S
9	5200807	0,250	0,190	0,750	0,064	0,064	0,064	0,500	29	24	N	19	R
10	5230807	0,023	0,023	0,750	0,016	0,125	0,190	1,000	29	25	N	> 20	S
11	5430807	0,012	0,023	0,250	0,008	0,094	0,125	1,000	31	27	N	> 20	S
12	5820907	1,500	1,000	0,500	0,250	0,032	0,125	0,750	29	27	N	6	R
13	5830907	1,000	1,000	0,500	0,190	0,047	0,125	1,500	27	25	N	6	R
14	5950907	0,023	0,023	1,000	0,012	0,125	0,064	1,000	28	24	N	> 20	S
15	6120907	0,032	0,032	0,500	0,012	0,064	0,190	1,000	30	25	N	> 20	S
16	6170907	0,023	0,023	0,380	0,023	0,064	0,094	0,500	28	25	N	> 20	S
17	6250907	0,047	0,032	0,500	0,004	0,094	0,125	1,000	27	25	N	> 20	S
18	6410907	0,094	0,047	0,380	0,023	0,064	0,125	1,000	25	23	N	19	R
19	7171007	0,023	0,023	0,500	0,012	0,190	0,190	1,000	27	24	N	> 20	S
20	7371007	0,032	0,032	0,500	0,016	0,064	0,064	1,000	25	23	N	> 20	S
21	8011007	1,000	0,750	0,500	0,380	2,000	2,000	0,750	0	0	/	6	R
22	8521007	0,012	0,023	0,500	0,016	0,016	0,064	1,000	29	25	N	> 20	S
23	451207	0,032	0,032	0,250	0,012	2,000	2,000	1,000	0	0	/	> 20	S
24	551207	0,032	0,023	0,500	0,012	0,094	0,125	0,750	27	25	N	> 20	S
25	2200108	0,047	0,125	0,380	0,008	0,094	0,190	0,750	27	25	N	> 20	S
26	2320108	0,094	0,047	0,380	0,006	0,064	0,094	0,750	32	28	N	16	R
27	2960208	0,023	0,016	0,500	0,016	0,064	0,094	0,047	34	30	N	> 20	S
28	4110308	0,016	0,016	0,380	0,023	0,125	0,190	0,750	29	28	N	> 20	S
29	4260308	0,750	0,500	0,380	0,250	0,094	0,125	0,750	30	29	N	6	R
30	4610408	0,032	0,064	0,380	0,250	0,094	0,125	0,750	30	29	N	18	R
31	4630408	0,006	0,023	0,500	0,016	0,064	0,064	1,500	33	30	N	> 20	S
32	4650408	0,125	0,250	0,380	0,094	0,094	0,190	1,500	36	29	N	6	R
33	5160408	0,064	0,016	0,380	0,004	0,023	0,094	1,500	38	34	N	> 20	S
34	6020408	0,380	0,500	0,500	0,250	0,023	0,190	0,750	34	30	N	6	R
35	7340508	0,016	0,023	0,500	0,023	0,094	0,125	1,000	30	25	N	> 20	S
36	7450508	0,012	0,016	0,500	0,008	0,064	0,125	1,500	31	27	N	> 20	S
37	7950608	0,023	0,094	0,500	0,012	0,064	0,094	2,000	35	30	N	17	R
38	8030608	0,016	0,032	0,500	0,016	0,064	0,125	0,750	30	25	N	> 20	S
39	8070608	0,012	0,016	0,500	0,016	0,094	0,125	1,500	33	27	N	> 20	S
40	8120608	0,012	0,016	0,380	0,016	0,094	0,125	2,000	29	26	N	> 20	S

AMOSTRA	CÓDIGO	PG E-test	TX E-test	VA E-teste	MP E-test	ERI E-test	CLI E-test	CIP E-test	ERI disco	CLI disco	D-Test	OXA	PERFIL
41	8130608	0,012	0,016	0,380	0,016	0,064	0,094	1,000	35	30	N	> 20	S
42	8500608	0,047	0,023	0,380	0,023	0,064	0,094	1,500	34	29	N	17	R
43	8560608	0,008	0,016	0,380	0,008	0,094	0,190	0,750	34	29	N	> 20	S
44	8700608	0,012	0,023	0,500	0,012	0,064	0,094	1,000	35	34	N	> 20	S
45	9210608	0,500	0,750	0,380	0,250	0,064	0,125	1,000	33	28	N	6	R
46	9680708	0,008	0,016	0,380	0,012	0,064	0,094	0,094	26	24	N	> 20	S
47	9820708	0,006	0,016	0,125	0,012	0,047	0,094	0,500	27	26	N	> 20	S
48	9880708	0,012	0,016	0,250	0,023	0,064	0,190	0,500	36	27	N	> 20	S
49	10190708	0,012	0,016	0,380	0,023	0,064	0,094	1,500	30	25	N	> 20	S
50	10370708	0,012	0,016	0,380	0,012	0,064	0,125	0,500	34	30	N	> 20	S
51	10650708	0,008	0,023	0,380	0,064	0,094	0,125	1,000	32	29	N	18	R
52	11150808	0,064	0,094	0,500	0,023	0,094	0,094	0,750	27	24	N	14	R
53	11600808	0,012	0,023	0,380	0,125	0,094	0,190	1,000	33	27	N	> 20	S
54	12040908	0,380	0,380	0,250	0,125	2,000	2,000	0,750	0	0	/	6	R
55	12680908	0,016	0,032	0,250	0,002	0,094	0,125	1,500	27	25	N	> 20	S
56	12810908	1,500	0,750	0,380	0,125	2,000	2,000	0,380	0	0	/	6	R
57	13280908	0,047	0,032	0,250	0,125	2,000	2,000	0,380	0	0	/	19	R
58	13581008	0,250	0,380	0,250	0,023	0,094	0,190	0,380	29	27	N	6	R
59	14891008	0,012	0,023	0,380	0,125	0,047	0,047	1,500	29	25	N	> 20	S
60	14961108	0,380	0,380	0,250	0,125	0,032	0,032	0,250	28	25	N	> 20	S
61	15811108	0,047	0,047	0,190	0,047	0,047	2,000	2,000	29	27	N	19	R
62	16121108	0,125	0,094	0,190	0,047	0,064	0,094	1,000	27	26	N	13	R
63	16731208	0,500	0,125	0,250	0,023	1,000	0,125	0,500	13	23	N	6	R
64	17421208	0,250	0,380	0,250	0,023	0,064	0,064	1,000	28	24	N	> 20	S
65	17721208	0,750	0,500	0,380	0,125	1,000	0,023	1,000	31	29	N	6	R
66	17761208	0,016	0,012	0,250	0,032	0,064	0,064	0,380	29	27	N	> 20	S
67	17821208	0,250	0,380	0,190	0,023	0,094	0,064	1,000	25	22	N	> 20	S
68	500109	0,032	0,023	0,190	0,032	2,000	2,000	0,750	0	0	/	19	R
69	820209	0,016	0,032	0,250	0,002	0,047	0,190	1,000	27	22	N	> 20	S
70	860209	0,125	0,047	0,125	0,032	0,094	0,125	0,500	25	23	N	> 20	S
71	1450209	0,023	0,047	0,250	0,047	0,047	0,125	0,250	28	23	N	6	R
72	1650309	0,064	0,064	0,250	0,023	2,000	2,000	0,500	0	0	/	17	R
73	1880309	0,023	0,047	0,250	0,012	0,094	0,125	1,000	28	24	N	18	R
74	2200309	0,094	0,094	0,250	0,002	0,064	0,125	0,500	26	23	N	> 20	S
75	2440309	0,064	0,094	0,380	0,023	0,064	0,064	0,500	28	25	N	14	R
76	3180409	0,094	0,094	0,250	0,047	0,094	0,190	1,000	28	24	N	11	R
77	3240409	0,016	0,023	0,380	0,004	0,064	0,094	1,000	29	26	N	> 20	S
78	3670409	1,000	0,750	0,190	0,380	2,000	2,000	1,000	0	0	/	6	R
79	3840509	0,016	0,032	0,250	0,002	0,094	0,125	0,750	30	25	N	> 20	S
80	3870509	1,500	1,000	0,380	0,190	0,064	0,125	0,500	29	25	N	6	R

AMOSTRA	CÓDIGO	PG E-test	TX E-test	VA E-teste	MP E-test	ERI E-test	CLI E-test	CIP E-test	ERI disco	CLI disco	D-Test	OXA	PERFIL
81	4130509	0,016	0,023	0,380	0,006	0,047	0,047	1,500	27	24	N	> 20	S
82	4780609	0,016	0,016	0,190	0,006	0,064	0,094	0,750	28	24	N	> 20	S
83	4990609	0,016	0,016	0,190	0,006	0,064	0,094	0,750	28	25	N	> 20	S
84	5240609	0,750	0,750	0,380	0,500	0,094	0,125	1,500	22	20	N	6	R
85	5280609	0,380	0,250	0,380	0,023	2,000	2,000	0,750	0	0	/	9	R
86	5290609	0,016	0,016	0,190	0,006	0,064	0,094	0,750	29	25	N	> 20	S
87	5670709	0,016	0,016	0,190	0,006	0,064	0,094	0,750	27	24	N	> 20	S
88	5880709	0,064	0,094	0,380	0,023	0,064	0,064	0,500	27	24	N	> 20	S
89	5910709	0,094	0,094	0,250	0,047	0,094	0,190	1,000	25	23	N	> 20	S
90	6020709	0,032	0,047	0,250	0,008	0,064	0,047	0,750	30	26	N	> 20	S
91	6670709	0,016	0,032	0,250	0,002	0,064	0,064	0,500	29	25	N	> 20	S
92	6870809	0,016	0,016	0,190	0,004	0,125	0,190	0,500	27	25	N	> 20	S
93	6930809	0,064	0,094	0,380	0,023	0,064	0,064	0,500	29	26	N	> 20	S
94	7000809	0,094	0,094	0,250	0,047	0,094	0,190	1,000	30	25	N	> 20	S
95	7610909	0,750	0,750	0,250	0,190	0,064	0,125	1,000	29	25	N	>20	S
96	7960909	0,016	0,032	0,250	0,002	0,064	0,064	0,500	29	25	N	>20	S
97	8291009	0,016	0,016	0,190	0,004	0,125	0,190	0,500	27	26	N	>20	S
98	9021009	0,500	0,750	0,250	0,190	0,023	0,094	0,500	35	30	N	6	R

ANEXO 3 – ESPECIFICAÇÕES DO PFGE

Equipamento

- CHEF DR III (BioRad Laboratories, Hercules, CA)

Enzimas

- Lisozima (Sigma)
- Mutanolisina (Sigma)
- Proteinase K (Invitrogen)
- Smal (Boehringer Mannheim)

Tampões

- PIV (10mM Tris-HCl, 1M NaCl)
- ES (0,5M EDTA, 1,0% sodium laurylsarcosine)
- TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA)
- TBE 0,5X (1M Tris, 0,01M EDTA, 1M ácido bórico)

Agarose

- Low-melting 2% (NuSieve GTG ágarose; FMC Bioproducts, Rockland, ME)
- Ágarose 1,1% (Seakem GTG ágarose, FMC Bioproducts)

Revelador

- Brometo de Etídio 1,0%

ANEXO 4 – ESPECIFICAÇÕES DO PCR

Tampões

- TBE 0,5X (1M Tris, 0,01M EDTA, 1M ácido bórico)

Agarose

- Ágarose 1,1% (Seakem GTG ágarose, FMC Bioproducts)

Primers

- *erm A forward* - 5' - TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA - 3'
- *erm A reverse* - 5' - TGA TTA TAA TTA TTT GAT AGC TTC - 3'
- *erm B forward* - 5' - CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC - 3'
- *erm B reverse* - 5' - GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG - 3'
- *mef A forward* - 5' - AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC - 3'
- *mef A reverse* - 5' - TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG - 3'

ANEXO 5 – REGIONAIS DE SAÚDE NO ESTADO DO PARANÁ

REGIONAL	CIDADE
1ª RS	Paranaguá
2ª RS	Curitiba
3ª RS	Ponta Grossa
4ª RS	Irati
5ª RS	Guarapuava
6ª RS	União da Vitória
7ª RS	Pato Branco
8ª RS	Francisco Beltrão
9ª RS	Foz do Iguaçu
10ª RS	Cascavel
11ª RS	Campo Mourão
12ª RS	Umuarama
13ª RS	Cianorte
14ª RS	Paranavaí
15ª RS	Maringá
16ª RS	Apucarana
17ª RS	Londrina
18ª RS	Cornélio Procópio
19ª RS	Jacarezinho
20ª RS	Toledo
21ª RS	Telêmaco Borba
22ª RS	Ivaiporã

ANEXO 6 – VACINAS PNEUMOCÓCICAS CONJUGADAS

Composição	Início da Aplicação (Idade)	Dose / Esquema Básico	Reforço	Via de Aplicação
Polissacarídeo pneumocócico de sete sorotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, 6B conjugado a proteína carreadora,	A partir dos 2 meses de idade até 59 meses	criança < 1 ano Início entre 2 a 6 meses de idade: 3 doses com intervalos de 60 dias (mínimo 30 dias) Início 7 a 11 meses de idade: 2 doses com intervalos de 60 dias (mínimo 30 dias)	Uma dose Pn7 entre 12 a 15 meses de idade Após 24 meses de idade: 1ª ref Pn23 (mínimo de 6 a 8 semanas após última dose Pn7) 2ª ref Pn23 (5 anos após 1ª ref)	Intramuscular
		criança > 1 ano Início 12 a 59 meses: duas doses com intervalos de 60 dias (mínimo 30 dias)	Após 24 meses de idade: 1ª ref Pn23 (mínimo de 6 a 8 semanas após última dose Pn7) 2ª ref Pn23 (5 anos após 1ª ref)	
Polissacarídeo pneumocócico purificado de 23 sorotipos	A partir de 5 anos de idade	1 dose	Uma dose após 3 a 5 anos	

Revisão em 2016/06 por:
 Dra. Tânia A. A. Sá - SE/SP
 Dra. Mariana A. P. Gama - SE/SP
 Dra. Tânia Ribeiro - SE/SP
 Diagramação: Ana Inery T. Pires - SE/SP